

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Medicina



TESIS DOCTORAL

**Evaluación de la existencia de un fenotipo linfopénico en la
enfermedad de Crohn diferencias basales, inmunológicas y evolutivas**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Valentín Roales Gómez

Directores

**Eduardo Crespo Suárez
Carlos Prieto Rodríguez**

Madrid, 2018

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA



EVALUACIÓN DE LA EXISTENCIA DE UN FENOTIPO
LINFOPÉNICO EN LA ENFERMEDAD DE CROHN.
DIFERENCIAS BASALES, INMUNOLÓGICAS Y EVOLUTIVAS

TESIS DOCTORAL DE:
VALENTÍN ROALES GÓMEZ

BAJO LA DIRECCIÓN DE:
CARLOS TAXONERA SAMSÓ
ENRIQUE REY DÍAZ-RUBIO

Madrid, 2017

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA



EVALUACIÓN DE LA EXISTENCIA DE UN FENOTIPO
LINFOPÉNICO EN LA ENFERMEDAD DE CROHN.
DIFERENCIAS BASALES, INMUNOLÓGICAS Y EVOLUTIVAS

TESIS DOCTORAL DE:
VALENTÍN ROALES GÓMEZ

BAJO LA DIRECCIÓN DE:
CARLOS TAXONERA SAMSÓ
ENRIQUE REY DÍAZ-RUBIO

Madrid, 2017

Agradecimientos

Realizar una obra como esta sin ayuda y sin colaboración de otras personas es impensable. Quiero por lo tanto en estas líneas dejar constancia de aquellos que han ayudado a que esta Tesis haya podido hacerse realidad.

En primer lugar quiero agradecer al Doctor Carlos Taxonera el hecho de hacer que me interesara por el mundo de la Enfermedad Inflamatoria Intestinal. Ha sido un gran apoyo en el plano personal y en el científico.

Por supuesto quiero dar las gracias a la Doctora Sánchez por su ayuda al hacerme comprender un poco el mundo de la inmunología.

A David Olivares por su ayuda imprescindible en la estadística de esta obra y a Mercedes Cañas por su colaboración desinteresada en las extracciones y en el aporte calórico en forma de chocolate.

A todos mis compañeros, adjuntos y residentes, por forzarme a ser cada día mejor profesional.

A mamá, papá, Paloma y Guillén por ser culpables de ser como soy.

A Elena, mi amor, por aguantar en solitario todas las horas en las que estuve escribiendo esta Tesis.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1.- RESUMEN/ABSTRACT	15
2.- INTRODUCCIÓN.....	23
2.1.- DEFINICIÓN	23
2.2.- ETIOPATOGENIA	24
2.2.1.- SUSCEPTIBILIDAD GENÉTICA	25
2.2.2.- FACTORES AMBIENTALES Y MICROBIOLÓGICOS	26
2.2.3.- EL EPITELIO INTESTINAL.....	28
2.2.4.- RESPUESTA INMUNITARIA EN LA EC	29
2.3.- EPIDEMIOLOGÍA.....	34
2.4.- ASPECTOS CLÍNICOS, CRITERIOS DIAGNÓSTICOS Y CLASIFICACIÓN DE LA ENFERMEDAD DE CROHN	35
2.4.1.- MANIFESTACIONES CLÍNICAS.....	35
2.4.2.- DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD DE CROHN.....	37
2.4.3.- CLASIFICACIÓN DE LA ENFERMEDAD DE CROHN	42
2.5.- TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE CROHN.....	44
2.5.1.- GLUCOCORTICOIDES	44
2.5.2.- MESALAZINAS	46
2.5.3.- INMUNOMODULADORES	47
2.5.4.- FÁRMACOS BIOLÓGICOS	48
2.5.5.- TRATAMIENTO ENDOSCÓPICO Y QUIRÚRGICO	49
2.6.- CONOCIMIENTO ACTUAL DE LA RELACIÓN ENTRE LINFOPENIA PRIMARIA Y LA ENFERMEDAD DE CROHN	51
3.- ANÁLISIS BASAL Y EVOLUTIVO DE UNA COHORTE DE PACIENTES CON ENFERMEDAD DE CROHN CON TENDENCIA A LA LINFOPENIA FRENTE A OTRA COHORTE DE PACIENTES CON ENFERMEDAD DE CROHN SIN LINFOPENIA	59

3.1.- FUNDAMENTO E HIPÓTESIS.....	59
3.2.- OBJETIVOS.....	60
3.3.- MATERIAL Y MÉTODOS	61
3.3.1.- DISEÑO, POBLACIÓN Y ÁMBITO	61
3.3.2.- RECOGIDA DE DATOS Y CODIFICACIÓN	62
3.3.3.- CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN	62
3.3.4.- CRITERIOS DE ASIGNACIÓN DE COHORTE	64
3.3.5.- VARIABLES DE ESTUDIO	65
3.3.6.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO	70
3.4.- RESULTADOS	71
3.4.1.- PACIENTES INCLUIDOS EN EL ESTUDIO.....	71
3.4.2.- ANÁLISIS DE LAS CARÁCTERÍSTICAS BASALES	73
3.4.3.- ANÁLISIS DURANTE LA EVOLUCIÓN DE LAS COHORTES	76
3.4.4.- ANÁLISIS MEDIANTE CURVAS DE SUPERVIVENCIA.....	82
3.5.- DISCUSIÓN.....	87

4.- EVALUACIÓN MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO MULTIPARAMÉTRICA DE SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS EN PACIENTES CON ENFERMEDAD DE CROHN CON TENDENCIA A LA LINFOPENIA PRIMARIA, PACIENTES CON ENFERMEDAD DE CROHN SIN LINFOPENIA Y CONTROLES SANOS	97
4.1.- FUNDAMENTO E HIPÓTESIS.....	97
4.2.- OBJETIVOS.....	102
4.3.- MATERIAL Y MÉTODOS	102
4.3.1.- DISEÑO, POBLACIÓN Y ÁMBITO	102
4.3.2.- RECOGIDA DE DATOS Y CODIFICACIÓN	103
4.3.3.- CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN	105
4.3.4.- VARIABLES DE ESTUDIO	108
4.3.5.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO	110
4.4.- RESULTADOS	111

4.4.1.- COMPARACIÓN ENTRE CANTIDAD Y ACTIVIDAD DE TREG	111
4.4.2.- COMPARACIÓN ENTRE CANTIDAD Y ACTIVIDAD DE BREG	116
4.4.3.- COMPARACIÓN ENTRE CANTIDAD Y ACTIVIDAD DE TREG- CD8	122
4.5.- DISCUSIÓN	127
5.- CONCLUSIONES FINALES DE ESTA OBRA	135
6.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	137

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Diferencias entre CU y EC	41
Tabla 2: Edad al diagnóstico según la clasificación de Montreal.....	43
Tabla 3: Localización según la clasificación de Montreal.....	43
Tabla 4: Comportamiento según la clasificación de Montreal	44
Tabla 5: Índice endoscópico de <i>Rutgeers</i>	51
Tabla 6: Etiología de linfopenia.....	52
Tabla 7: Características basales	73
Tabla 8: Diferencias entre A3 y A1+A2	74
Tabla 9: Diferencias entre valores de linfocitos.....	74
Tabla 10: Diferencias entre B1, B2 y B3.....	76
Tabla 11: Diferencias entre B1+B2 y B3.....	77
Tabla 12: Diferencias en la afectación perianal	77
Tabla 13: Diferencias en la artropatía asociada a EII	77
Tabla 14: Diferencias entre tasas de tratamiento con IMM.....	78
Tabla 15: Diferencias entre tasas de tratamiento con fármacos biológicos	78
Tabla 16: Diferencias en las tasas de tratamiento quirúrgico	79
Tabla 17: Estimación de riesgo de cirugía resectiva.....	79
Tabla 18: Diferencias en la aparición de granulomas	80
Tabla 19: Diferencias en la mielotoxicidad	80

Tabla 20: Modificación de dosis o suspensión del IMM en la mielotoxicidad.....	81
Tabla 21: Diferencias en la aparición de pancreatitis aguda en pacientes en tratamiento con IMM	82
Tabla 22: Probabilidad acumulada de tratamiento con biológicos.....	84
Tabla 23: Probabilidad acumulada de tratamiento con IMM.	85
Tabla 24: Probabilidad acumulada de cirugía resectiva.	87
Tabla 25: Anticuerpos monoclonales.....	105
Tabla 26: Porcentaje de subtipos de linfocitos Treg sobre el total de linfocitos CD4+ y expresión individualizada de perforina de estas subpoblaciones.	111
Tabla 27: Diferencias en los Treg entre NEC y ECNL.	112
Tabla 28: Diferencias en los Treg entre NEC y ECTL.....	112
Tabla 29: Diferencias en los Treg entre ECNL y ECTL.	113
Tabla 30: Porcentaje de subtipos de linfocitos Treg sobre el total de linfocitos B y expresión individualizada de perforina de estas subpoblaciones.	116
Tabla 31: Diferencias en Breg entre NEC y ECNL.....	117
Tabla 32: Diferencias en Breg entre NEC y ECTL.	118
Tabla 33: Diferencias en Breg entre ECNL y ECTL.....	119

Tabla 34: Porcentaje de subtipos de linfocitos TregCD8+ sobre el total de linfocitos CD8+ y expresión individualizada de perforina de estas subpoblaciones.	122
Tabla 35: Diferencias en TregCD8+ entre NEC y ECNL.	123
Tabla 36: Diferencias en TregCD8+ entre NEC y ECTL.....	123
Tabla 37: Diferencias en TregCD8+ entre ECNL y ECTL.	124

LISTA DE ABREVIATURAS

EC	Enfermedad de Crohn
CU	Colitis ulcerosa
EII	Enfermedad Inflamatoria Intestinal
ECTL	Enfermedad de Crohn con tendencia a la linfopenia
ECNL	Enfermedad de Crohn no linfopénica
IMM	Fármacos inmunomoduladores
AINEs	Anti-inflamatorios no esteroideos
CPA	Células presentadoras de antígenos
Th1	Linfocitos T colaboradores tipo 1
Th2	Linfocitos T colaboradores tipo 2
Treg	Linfocitos T reguladores
Breg	Linfocitos B reguladores
TregCD8+	Linfocitos T reguladores CD8+
TGF- β	Factor de crecimiento tumoral <i>beta</i>
TNF- α	Factor de necrosis tumoral <i>alfa</i>
IFN- γ	Interferón <i>gamma</i>
CMV	Citomegalovirus
ID	Intestino delgado
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
IPEX	Síndrome de disregulación autoinmune ligado al cromosoma X asociado a poliendocrinopatía

1.- RESUMEN

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Crohn (EC) es una patología de naturaleza autoinmunitaria capaz de afectar a diferentes porciones del aparato digestivo y que junto a la Colitis Ulcerosa (CU) conforma el grupo de Enfermedades Inflammatorias Intestinales (EII). El íleon terminal es la primera localización estadísticamente afectada por esta enfermedad, aunque también puede afectarse el colon, otras localizaciones de intestino delgado o porciones aún más proximales del tubo digestivo.

En la práctica clínica habitual se ha detectado que existe una subpoblación de pacientes con EC que en el momento del diagnóstico y sin que exista interacción con fármacos o enfermedades subyacentes capaces de alterar el conteo hematológico presentan tendencia a la linfopenia primaria. En estos pacientes se aprecia normalidad numérica del resto de células blancas, hematíes o plaquetas.

Por el momento, salvo un limitado estudio que se remonta a 1986, no se ha estudiado de manera sistemática la existencia de una forma diferenciada de evolución o características basales en estos pacientes con Enfermedad de Crohn y tendencia a la linfopenia (ECTL). Por lo tanto actualmente no existe confirmación científica de la existencia de un posible fenotipo con tendencia a la linfopenia en la EC desconociéndose sus características propias tanto clínicas como inmunológicas.

Se ha valorado en diferentes estudios el papel que tienen los diferentes linfocitos reguladores en la patogenia la EC y se ha apreciado que existen diferencias entre los pacientes con EC y el resto de la población general tanto en lo referente a la cuantía en sangre periférica, como en mucosa afectada por la enfermedad. De la misma forma, la activación de estas células reguladoras, que tienen el papel de frenar la inflamación al ser activadas, también ha sido valorada en los pacientes con EC.

Se desconoce a día de hoy si en estos pacientes ECTL existe alguna característica diferencial respecto a la cantidad o actividad de los diferentes subtipos linfocitarios. La evaluación de estos posibles rasgos distintivos podría explicar desde el punto de vista inmunológico la existencia del referido fenotipo con tendencia a la linfopenia.

Esta tesis se compone por lo tanto de dos protocolos que buscan estudiar las diferencias entre los pacientes con ECTL y los pacientes con EC no asociada a linfopenia (ECNL). En un primer protocolo se busca analizar mediante un estudio de cohortes las diferencias entre una cohorte ECTL (establecida por unos estrictos criterios de selección) y otra de pacientes ECNL respecto a las características basales y a la evolución clínica durante un periodo de seguimiento de seis años.

En un segundo estudio se trata de evaluar mediante citometría de flujo multiparamétrica las diferencias cuantitativas entre subpoblaciones linfocitarias reguladoras y la diferente activación que presentan estas células, medida como

expresión de perforina intracelular entre un grupo de pacientes con ECTL, otro con ECNL y un último grupo de controles sanos.

OBJETIVOS

El objetivo global de esta tesis es analizar desde un punto de vista clínico (tanto basal como evolutivo) e inmunológico las diferencias entre los pacientes con ECTL y el resto de pacientes con EC. De confirmarse estas diferencias, se podría demostrar la existencia de un fenotipo linfopénico en la EC con características propias que permitiera eventualmente prever diferencias en el curso clínico o diseñar en estos pacientes ECTL nuevas terapias en el futuro basadas en su patogenia inmunológica.

METODOLOGÍA

En el primer protocolo se ha desarrollado un estudio retrospectivo de cohortes en el que se evaluaron las características basales y variables clínicas evolutivas de una cohorte de pacientes con ECTL y otra con ECNL de forma retrospectiva durante 6 años.

En el segundo protocolo, se seleccionó una muestra de pacientes con ECTL, otra con ECNL y una última con controles sanos pareados por edad y sexo. Fueron sometidos los pacientes a una citometría de flujo multiparamétrica para evaluar las diferencias entre las distintas subpoblaciones linfocitarias reguladoras de ambos grupos y su activación medida por la expresión intracelular de perforina.

CONCLUSIONES

Con los datos obtenidos en ambos protocolos podemos concluir que existe un fenotipo con tendencia a la linfopenia que engloba el 20% aproximadamente de pacientes con EC, que presenta un diagnóstico en edades mayores, con mayor desarrollo de mielotoxicidad al usar inmunomoduladores (IMM) y con mayor tasa de cirugías resectivas. Este grupo ECTL presenta una mayor proporción de células reguladoras en sangre periférica durante la remisión clínica, pero con una activación celular menor que en los pacientes ECNL.

INTRODUCTION

Crohn's disease (CD) is an autoimmune illness capable of involving different portions of the digestive tract. Together with Ulcerative Colitis it forms the group of Inflammatory Bowel Diseases. The terminal ileum is the first site to be statistically affected by this disease, but it can also affect the colon, other portions of small bowel or even more proximal portions of the digestive tract.

In clinical practice, it has been found that there is a subpopulation of patients with Crohn's disease that, at the time of diagnosis and without interaction with drugs or underlying diseases capable of altering hematological counts present a tendency to primary lymphopenia. In these patients numerical normality of the rest of white cells, red blood cells or platelets is appreciated.

For the moment, except for a limited study dating back to 1986, there has been no systematic studies evaluating the existence of a differentiated form of evolution or baseline characteristics in these patients with Crohn's disease and tendency to lymphopenia (CDTL). Therefore, there is currently no scientific confirmation of the existence of a possible phenotype with a tendency to lymphopenia in CD, without knowing its own clinical and immunological characteristics.

The role of different regulatory lymphocytes in the pathogenesis of CD has been evaluated in different studies and it has been observed that there are differences between patients with CD and the rest of the general population in terms of amount in peripheral blood and affected mucosa. In the same way, the

activation of these regulatory cells, which have the role of stopping inflammation when activated, has also been evaluated in patients with CD.

It is unknown at this time whether there is any differential characteristic in these CDTL patients regarding the quantity or activity of the different lymphocyte subtypes. The evaluation of these possible distinctive features could explain from the immunological point of view the existence of said phenotype with tendency to lymphopenia.

This scientific article consists of two protocols that seek to study the differences between patients with CDTL and patients with non-lymphopenia-associated CD (NLCD). In a first protocol, a cohort study was used to analyze the differences between an CDTL cohort (established by strict selection criteria) and another one of NLCD patients with respect to the baseline characteristics and the clinical evolution during a six-year follow-up period.

In a second study we tried to evaluate by flow cytometry quantitative differences between regulatory lymphocyte subpopulations and the different activation that these cells present, measured as expression of intracellular perforin between a group of patients with CDTL, another with NLCD and a group of healthy controls.

OBJECTIVES

The overall objective of this article is to analyse from a clinical (both basal and evolutionary) and immunological point of view the differences between patients

with CDTL and the rest of patients with CD. If these differences were confirmed, the existence of a lymphogenic phenotype with its own characteristics could be demonstrated. This could eventually provide for differences in the clinical course and to design in these CDTL patients new therapies based on their immunological pathogenesis.

METHODOLOGY

In the first protocol a retrospective study was developed in which the baseline characteristics and clinical evolutionary variables of a cohort of patients with CDTL and another NLCD were retrospectively evaluated for 6 years.

In the second protocol, a sample of patients with CDTL, another one with NLCD and one with healthy controls matched for age and sex were selected. Patients were submitted to multiparametric flow cytometry to evaluate the differences between the different regulatory lymphocyte subpopulations of both groups and their activation measured by the intracellular expression of perforin.

CONCLUSIONS

With the data obtained in both protocols, we can conclude that there is a phenotype with a tendency to lymphopenia that encompasses approximately 20% of patients with CD, which presents a diagnosis in older ages, with greater development of myelotoxicity when using immunomodulators (IMM) and with higher rate of resective surgeries. This CDTL group presents a higher proportion of regulatory cells in peripheral blood during clinical remission, but with a lower cellular activation than in NLCD patients.

2.- INTRODUCCIÓN

2.1.- DEFINICIÓN

La EC forma parte del grupo de las EII. Es una patología inflamatoria crónica, capaz de afectar a cualquier localización del tracto gastrointestinal (clásicamente desde la boca hasta el ano) y que cursa en forma de brotes (1). Esta enfermedad comparte varias características comunes con la CU, la otra gran EII, difiriendo de la misma en lo relacionado a la afectación transmural, la localización parcheada, la habitual presencia de granulomas, la afectación perianal frecuente y las manifestaciones extracolónicas.

El tratamiento de esta patología, por lo tanto, dependerá del momento en el que nos encontremos, siendo muy diferente si tenemos el objetivo de mantener la remisión de la enfermedad o si nuestro objetivo es suprimir la actividad en el brote. Dado que hay ocasiones en las que se producen estenosis o complicaciones perforantes como consecuencia de actividad aguda o crónica de la enfermedad, la cirugía también es otra opción terapéutica que puede ser necesaria en hasta el 80% de los pacientes con EC (2).

La etiología de esta enfermedad es desconocida, siendo probablemente multifactorial y con innegable base autoinmunitaria. Varias teorías han tratado de explicar la etiopatogenia de la EC, siendo la más aceptada la que engloba su etiología como una desregulación autoinmunitaria en la que está envuelta la flora bacteriana en un paciente genéticamente e inmunológicamente predispuesto (3,4).

El tratamiento de la EC está en continua evolución y consiste en fármacos para mantener la remisión de la enfermedad como IMM y fármacos biológicos y otras moléculas para la supresión del brote agudo (glucocorticoides, anticuerpos monoclonales y en algunas ocasiones mesalazina). El constante estudio y el paulatino avance tecnológico sobre la inmunología de esta enfermedad han permitido que la farmacoterapia haya dado un vuelco en los últimos 15 años con la aparición de las terapias biológicas: anticuerpos monoclonales contra el TNF alfa o contra otras dianas inmunológicas que a pesar de su alto coste, están modificando la historia natural de los pacientes más graves con buena respuesta en la mayoría de casos.

La cirugía es una opción terapéutica que va a ser necesaria en alguna de sus modalidades en una proporción importante de pacientes con EC (5) a pesar del tratamiento médico óptimo. Las tasas de cirugía han caído en los últimos años con la aparición de las nuevas terapias a las que hemos aludido previamente. Es importante destacar que de manera contraria a lo que ocurre en la CU, la recidiva de la EC posquirúrgica tras cirugía resectiva es la norma. A pesar de que la etiología no está inmunológicamente bien aclarada, se presenta a pesar de una optimización de la terapéutica hasta en un 80% de los pacientes en algunas series a los 5 años (6).

2.2.- ETIOPATOGENIA

La etiología de la EC reside en cuatro pilares básicos que a continuación procedemos a describir.

2.2.1.- SUSCEPTIBILIDAD GENÉTICA

Entre un 10 y un 25% de pacientes con EC tienen un familiar de primer o segundo grado con una EII, dato que hizo suponer desde su descripción como enfermedad individual que se trataba de una enfermedad con importante carga genética.

En los últimos años los avances técnicos en el conocimiento de la genética han permitido realizar estudios de asociación de genoma completo (GWAS), permitiendo conocer asociaciones entre pacientes con EC (7). Se han conocido gracias a estos GWAS la existencia de 163 *loci* de genes asociados a EII en general, y 30 en particular para EC. Las variantes genéticas que confieren susceptibilidad a presentar una EC están relacionadas con la inmunidad innata, los fenómenos de autofagia y la fagocitosis. El análisis de mapeo de pacientes con EC ha revelado que el gen NOD2 es el más involucrado en estas asociaciones (8). Este gen codifica una proteína que inicia la respuesta inmunitaria innata tras contactar con péptidos de la membrana celular de bacterias Gram negativas y Gram positivas, además de regular los fenómenos de presentación de antígeno e inducción de autofagia, con la posterior resistencia a infección por bacterias intracelulares. En esta función además del gen NOD2 también están implicados polimorfismos del gen ATG16L1 (9). El riesgo de presentar EC puede aumentar hasta 40 veces en función del polimorfismo que se presente, ya que algunos condicionan la pérdida de función de estos genes (10).

En los estudios de GWAS también se ha detectado una asociación crítica de polimorfismos en el gen IL23R (11). Este gen codifica una subunidad del receptor de IL23, una citoquina proinflamatoria involucrada en la generación de linfocitos supresores Th17. Además del gen IL23R se han apreciado asociaciones en pacientes con EC en múltiples genes que regulan la cascada de señales que regula IL23 y linfocitos Th17 como por ejemplo IL12B, JAK2 y STAT3 (12). En el caso del gen IL12B, que codifica la subunidad p40, común para el receptor de IL12 y IL23, se ha apreciado en estudios GWAS que hay polimorfismos comunes con otras patologías autoinmunitarias además del EC y la CU, sugiriendo por lo tanto que estas enfermedades tengan ciertas raíces etiopatogénicas comunes (13).

2.2.2.- FACTORES AMBIENTALES Y MICROBIOLÓGICOS

A pesar de que los estudios genéticos han revelado la importancia de los polimorfismos heredados, los estudios realizados a gemelos idénticos demuestran que en el desarrollo de la enfermedad hay factores ambientales implicados. Un amplio espectro de estos factores aporta riesgo para presentar EC, como el tabaco, tóxicos ingeridos, dieta, estrés social y factores microbiológicos.

El tabaco, por motivos no bien explicados, es un factor de riesgo en la EC. Aumenta la posibilidad de diagnóstico de EC con un *Hazard Ratio* entre 1.4 y 1.9, mientras que protege de la CU (14). Se desconoce las causas de este efecto, pero se teoriza que la nicotina u otros productos podrían afectar a la permeabilidad intestinal, la microvasculatura o al tono de las fibras lisas (15).

La dieta produce en el desarrollo de EC un efecto complicado de demostrar, aunque hay datos que sugieren que la “dieta occidental” se asocia con un riesgo aumentado de desarrollar EC y posiblemente CU (16,17). Los anti-inflamatorios no esteroideos (AINEs) se asocian con un riesgo aumentado para el desarrollo de EC y CU y se cree que influyen en estas enfermedades por lesión mucosa directa mediante la reducción de la producción de prostaglandinas (18,19). El estrés social se ha propuesto como factor favorecedor en EC y CU (20).

En lo que respecta a la flora microbiota comensal intestinal, se cree que juega un rol básico en el inicio y en la perpetuación de la EII basándose en una desregulación del equilibrio inmunológico flora–huesped (21). Varios estudios llevados a cabo con animales han demostrado que el uso de antibióticos en el inicio de la EII es efectivo en el tratamiento de la misma y que en casi todos los modelos con ratones es preciso que exista flora comensal intestinal para que exista inflamación (22).

Estudios microbiológicos llevados a cabo en pacientes con EC, han evaluado la flora intestinal objetivando una relativa menor cantidad de Firmicutes y Bacteroidetes y una mayor cantidad de Enterobacteriae respecto de la población general (23). Además, hay un aumento de la presencia de *E. coli* asociados a la mucosa de íleon y colon de forma muy marcada en pacientes con EC y agregación familiar (24). Pese a todos los estudios, nuestra capacidad de comprensión de la importancia de la microflora intestinal en la EII en general y en la EC en particular es aún decididamente insuficiente.

2.2.3.- EL EPITELIO INTESTINAL

El epitelio intestinal representa una barrera física entre la luz intestinal y el territorio intravascular. Para discriminar entre flora comensal y patógenos intestinales, las células del epitelio intestinal expresan receptores de reconocimiento de patrón (PRR) que regulan los fenómenos de tolerancia que permiten en situación basal la homeostasis inmunitaria intestinal y la renovación constante del propio epitelio. Es en esta homeostasis donde la actividad de los linfocitos NF *Kappa-Beta*, es crucial para la activación de la respuesta inmunitaria o para la supresión de la misma (25). Ya en 1972 se describió la hipótesis de que el defecto primario de la EC se encontraba en el funcionamiento de la barrera epitelial intestinal que comprometía su función con el consecuente aumento del paso de antígenos a través de la mucosa intestinal. Esto produciría una activación del sistema inmunitario y la posterior inflamación crónica intestinal (26). Otros estudios posteriores han evidenciado que los pacientes con EII presentan una mayor permeabilidad intestinal en comparación con sujetos sanos o con ellos mismos previamente a desarrollar clínica de EC (27). Se desconoce el mecanismo exacto por el que la disfunción de la barrera intestinal causa la inflamación, ya que la permeabilidad intestinal aumentada en individuos sanos no produce por sí misma la enfermedad. Se cree por lo tanto que debe haber algún otro componente en la barrera o fuera de ella que permita el desarrollo de la clínica, como por ejemplo una sobreactividad de las células dendríticas presentadoras de antígenos (CPA) localizadas en la lámina propia. Según esta hipótesis la permeabilidad aumentada haría que las CPA recibieran mayor estímulo antigénico,

provocando su hiperactivación crónica alterando el microambiente inmunitario de forma secundaria (28).

2.2.4.- RESPUESTA INMUNITARIA EN LA EC

Los efectos combinados de la genética, los factores ambientales, la microflora intestinal y una función alterada de la barrera mucosa culminan en la activación persistente de la respuesta del sistema inmunitaria. En varios estudios realizados sobre pacientes con EII y sobre modelos animales se aprecian como existen importantes poblaciones celulares inmunitarias y mediadores proinflamatorios presentes en el inicio de la inflamación provocando su perpetuación (29,30). En la EC se describe una actividad importante del sistema inmunitaria adaptativo, con abundante presencia de linfocitos CD4+`con predominancia de linfocitos T colaboradores tipo 1 (Th1) en la mucosa intestinal afectada de pacientes con EC activa, en contraste con la predominancia de linfocitos T colaboradores tipo Th2 que aparece en la mucosa afectada por CU (31).

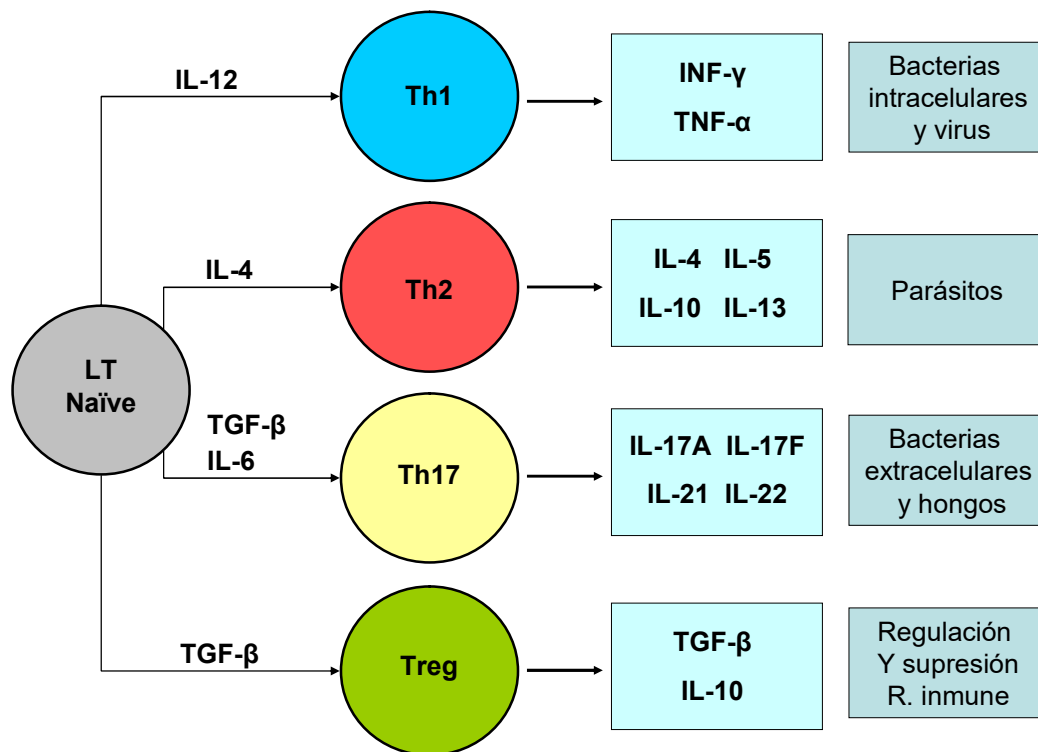


Figura 1: Subtipos de LT

Otra subpoblación dentro de los linfocitos CD4+, los linfocitos Th17, han demostrado tener un papel importante en la EII (32). Estos Th17 son inducidos por la presencia de IL6 y factor de crecimiento tumoral *beta* (TGF- β), su expansión depende de IL-23 y son suprimidos por los factores que promueven la estimulación de Th1 y Th2. Son productores de grandes cantidades de IL17A, IL17F, IL21 e IL22. La función de los Th17 es controvertida, aunque se piensa que tienen un efecto proinflamatorio y por lo tanto un rol importante en la patogénesis, siendo por lo tanto una teórica diana terapéutica (33–35).

Los linfocitos T reguladores CD4+ (Treg) son un subtipo celular de linfocitos T clave a la hora de la homeostasis inmunológica a nivel intestinal mediante la supresión de la respuesta inmunitaria cuando esta no es necesaria. Los Treg se generan durante el desarrollo (Treg naturales) o pueden ser inducidos

periféricamente desde células T CD4+ convencionales (Treg inducidos). En ausencia de mediadores inflamatorios el desarrollo de estas células Treg que son típicamente FoxP3+ es estimulado por TGF- β produciendo la supresión de la respuesta inmunitaria (36,37). Sin embargo, en presencia de citoquinas proinflamatorias como IL6, el TGF- β induce la diferenciación de Th17, células de que producen un efecto opuesto a las Treg. Además de estas células Treg clásicas, que descienden de la especialización de un LT CD4+, existen otras dos subpoblaciones de linfocitos con capacidad reguladora o supresora: los linfocitos B reguladores (Breg) y los linfocitos CD8+ reguladores (TregCD8+) (38).

Los linfocitos B son los encargados de la inmunidad humoral mediante la producción de anticuerpos, siendo en torno al 15% de los linfocitos totales. Su subgrupo regulador, que se caracteriza mediante citometría de flujo con la expresión en su membrana de CD19 y FoxP3 (aunque también se puede caracterizar mediante CD19+CD25+), presenta actividad reguladora mediante la producción de IL-10 y la reducción de interferón *gamma* (IFN- γ), factor de necrosis tumoral *alfa* (TNF- α) e interleuquina 17 (IL-17) además de modular a los Treg clásicos mediante el estímulo de su diferenciación desde LT CD4+ *naïve*, contribuyendo a la modulación de la respuesta inmunitaria (39).

Por otra parte, los linfocitos T CD8+, clásicamente denominados citotóxicos, presentan también una subpoblación reguladora (TregCD8+) que actúa mediante citoquinas como IL-10 y TGF- β y por el mecanismo por contacto célula-célula gracias a la vía granzima-perforina (40).

Existen varios estudios que evalúan específicamente a las células Treg en la EC, aunque todos ellos presentan unos tamaños muestrales limitados. Hay datos contradictorios sobre si existe relación entre los fenómenos de inmunidad ligados a los Treg y la actividad de la EC (41). Tampoco existe un criterio unánime a la hora de definir el número y la proporción de Treg en sangre periférica en los pacientes con EC, existiendo importante variabilidad en la literatura descrita (42). Varios autores sugieren que durante la actividad de la enfermedad la proporción de Treg en sangre periférica decae respecto a la remisión de manera llamativa, hipotetizando que es un reflejo de la captura de Treg en los tejidos afectados. En pacientes que responden al tratamiento con fármacos biológicos como infliximab (anticuerpo monoclonal anti TNF) se ha apreciado en un estudio un aumento significativo del número de Treg en sangre periférica, planteándose que la medición de los Treg tras el inicio del tratamiento puede ser capaz de predecir una respuesta favorable al tratamiento con este tipo de moléculas (43). Estos datos han planteado la hipótesis de que pueda existir un secuestro de los Treg por parte de la enfermedad activa en localizaciones aún no bien descritas.

Tradicionalmente, la patogénesis de la EII se atribuyó primariamente a una respuesta adaptativa del sistema inmunitaria frente a antígenos lumbinales. Esta teoría ha sido revisada en los últimos 12 años, siendo la principal hipótesis actual la de un defecto primario de la respuesta inmunitaria innata. Varios estudios dirigidos a la explicación de esta hipótesis han determinado que existe una alteración en la respuesta de la inmunidad innata intestinal a varias

citoquinas, produciendo un efecto dicotómico positivo y negativo que llevaría a la inflamación crónica intestinal mediante una disfunción inmunitaria. Este efecto incluiría citoquinas como TNF- α , IL-1 β , IL-18, IL-33 y IL-1A, así como moléculas de señalización como MAPK o MyD88 que se han asociado con actividades proinflamatorias (44).

Estas moléculas generan inicialmente una respuesta inflamatoria aguda que produce una eliminación de excesivo número de bacterias alterando la homeostasis entre la barrera y la luz intestinal. Durante la posterior fase de inflamación crónica, otros mecanismos de control de la homeostasis se alteran produciendo sobre o infraproducción de citoquinas como por ejemplo el TNF- α , molécula que fue el primer objetivo sobre el que se diseñó una terapia monoclonal. Sin embargo, el TNF- α puede presentar propiedades antiinflamatorias en función del contexto clínico y el objetivo celular que predomine reflejando nuestro limitado conocimiento del mapa tridimensional inmunológico molecular (45).

Por lo tanto, es claro que cada vez existen más datos a favor de que la inflamación intestinal se produce a través de diferentes escalones y vías en su mayor parte desconocidas por la ciencia actual. Existe la posibilidad de que la EC sea la expresión clínica común de diferentes etiologías generando distintos inmunofenotipos. El estudio de estos, aún no bien finalizado, permitiría en el futuro la predicción clínica evolutiva y una individualización del tratamiento de la EC.

2.3.- EPIDEMIOLOGÍA

Los estudios epidemiológicos más potentes se han desarrollado en el mundo occidental (Estados Unidos de América y el oeste de Europa), por lo que la epidemiología que describimos en este capítulo se refiere mayoritariamente a esta parte del mundo desarrollado.

En el último medio siglo las cifras de incidencia y de prevalencia de las EII en general y de la EC en particular han aumentado en los países de estas regiones. En Asia y Oriente medio, los estudios realizados (de menor potencia) reflejan prevalencias e incidencias menores, aunque también con tendencia creciente (46,47).

La incidencia en el mundo occidental de la EC es de 3.1 a 20.2 casos por 100.000 personas y año según las series y los países mientras que la prevalencia de esta enfermedad se estima en torno a 201 pacientes por 100.000 personas, levemente inferior a la prevalencia de la CU (238 pacientes por 100.000 personas). Existe una importante variación geográfica, con aumento progresivo de los casos al ascender en latitud, de manera similar a otras enfermedades autoinmunitarias de otros ámbitos como la esclerosis múltiple (48).

La edad de debut de la EC se presenta con un patrón en dos picos. El primero es el más importante cuantitativamente y se sitúa en la segunda y tercera

década de la vida, mientras que el segundo, más modesto, se localiza en la sexta y séptima década (49).

En relación al sexo, parece haber una leve predominancia femenina en la EC, sobre todo en edades límites, generando la hipótesis de que el factor hormonal pueda afectar en el desarrollo de la enfermedad (50).

2.4.- ASPECTOS CLÍNICOS, CRITERIOS DIAGNÓSTICOS Y CLASIFICACIÓN DE LA ENFERMEDAD DE CROHN

2.4.1.- MANIFESTACIONES CLÍNICAS

La EC es una entidad patológica capaz de generar múltiples síntomas y signos debido a su ubicua capacidad de afectación en el tracto gastrointestinal y al carácter transmural de la misma. Por lo tanto ya que sería sumamente complejo y ajeno al objetivo de este texto el enumerar la totalidad de efectos clínicos que podría presentar la EC, los agruparemos por “comportamiento” de la propia enfermedad.

En lo que respecta al carácter inflamatorio de la enfermedad, el dolor abdominal (con localización que depende de las porciones afectas de colon o ID), la diarrea de tipo inflamatorio y características orgánicas, la fiebre y la rectorragia o hematoquecia son los síntomas más frecuentes de la EC. Típicamente la diarrea no respeta el sueño, presenta un curso crónico o

subagudo y se suele acompañar de deterioro del estado general y pérdida ponderal como manifestaciones sistémicas, permitiendo diferenciarlas de patologías más benignas como el espectro de las enfermedades funcionales o las enterocolitis infecciosas.

Respecto al carácter estenosante de la actividad de la enfermedad, ya sea por inflamación aguda, por estenosis fibrosa producida por la cronicidad de la enfermedad o por solapamiento de ambas, los síntomas que presentan los pacientes son los típicos de las obstrucciones o suboclusiones intestinales en función del calibre luminal. La ausencia de deposiciones o ventoseo, la diarrea líquida por rebosamiento, las náuseas o vómitos y una vez más el dolor abdominal son las manifestaciones más frecuentes en este tipo de patrón de la EC (51).

Al ser la EC una patología transmural e inflamatoria, es frecuente que se manifieste con un comportamiento “penetrante”, en forma de abscesos y colecciones intraperitoneales, fístulas (enteroentéricas, enterovesicales, enterovaginales, enterouterinas o enterocutáneas entre otras posibilidades) o menos frecuentemente como perforaciones libres a cavidad peritoneal con peritonitis secundarias.

Es asimismo muy típica la afectación perianal en la EC en forma de fístulas simples o complejas, fisuras de comportamiento atípico y abscesos perineales que complican mucho el tratamiento de la enfermedad y que suelen requerir cirugía con mucha frecuencia (5).

A nivel sistémico, la EC presenta afectación extraintestinal. Son muy típicas la patología articular como la presencia de artralgias secundarias a artritis inflamatorias periféricas o de eje central (las primeras típicamente en relación a la actividad aguda de la EC), patología cutánea y de mucosas en forma de eritema nodoso, estomatitis aftosa o pioderma gangrenoso (más típico este último de la CU) o clínica oftalmológica como uveítis, epiescleritis o patología corneal (52–54).

2.4.2.- DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD DE CROHN

La primera premisa a tener en cuenta en lo referente a la EC es que no hay ningún dato patognomónico a la hora de su diagnóstico, y que este se basa en la integración de varios pilares además de la sospecha clínica: endoscopia, histopatología, pruebas de imagen y datos analíticos.

2.4.2.1.- Endoscopia

Los hallazgos endoscópicos de la EC clásicamente se describen como erosiones aftosas, úlceras geográficas, en sacabocados o serpiginosas, con mucosa no afectada entre áreas afectadas y con habitual patrón en empedrado. Ante la sospecha de EC o de EII en general está indicada la realización de colonoscopia con ileoscopia para valoración macroscópica y toma de biopsias (55).

La enteroscopia y la cápsula endoscópica son procedimientos diagnósticos que pueden tener lugar en el diagnóstico de la enfermedad de localización proximal a íleon terminal.

Además de su papel diagnóstico, la colonoscopia puede tener una capacidad terapéutica a la hora de la dilatación de estenosis fibrosas colónicas o de íleon terminal (56).

2.4.2.2.- Pruebas de imagen

El tránsito intestinal mediante ingesta de contraste oral baritado es una exploración clásica en el diagnóstico de EC para valorar la afectación (contorno y calibre de luz intestinal) de segmentos de intestino delgado (ID) proximales a los que una ileoscopia convencional alcanza. Con el desarrollo de la entero-RMN e incluso del entero-TC, este estudio baritado está progresivamente en desuso por su menor capacidad diagnóstica y su carga ionizante nada despreciable.

La radiografía de abdomen convencional AP y en bipedestación es una prueba de muy bajo coste y de baja radiación que es extremadamente útil en casos de EC en los que sospechemos obstrucción o suboclusión intestinal por afectación inflamatoria o fibrótica (57).

Actualmente, la realización de la entero-RMN en los centros en los que se dispone de la infraestructura y de los recursos humanos necesarios está en progresión en el diagnóstico de los pacientes con EC en los que se sospecha

afectación proximal. Se trata de una exploración inocua en relación a radiaciones ionizantes, bien tolerada y que además, en manos de un radiólogo experto, permite la diferenciación entre afectación aguda inflamatoria y la afectación crónica fibrótica, con la posterior optimización en el tratamiento (58).

El entero-TC se utiliza con mayor asiduidad en el momento agudo en el que se sospecha actividad penetrante de la enfermedad (abscesos o perforación) o en un paciente que no tolera la realización de una RMN y se sospeche la ya mencionada afectación proximal. Las ventajas de la RMN frente a la tomografía computerizada son la ausencia de radiación ionizante y la capacidad de caracterizar el tipo de afectación mural en los segmentos afectos. El TC está disponible en casi todos los centros hospitalarios y tiene un menor coste por respecto a la entero-RMN.

La ecografía abdominal puede tener su papel en la EC con la valoración de la presencia de ileítis terminal en general o de aumento de calibre mural o dilatación luminal de asas intestinales en general. Presenta en manos de un radiólogo experto una buena sensibilidad y especificidad a la hora de descartar patología extraluminal aunque en cualquier caso menor que en la TC o la RMN (59).

En relación a la patología perianal, la ecoendoscopia (USE) inferior y la RMN pélvica son las exploraciones junto con la exploración bajo anestesia con mayor potencia diagnóstica para descartar fístulas y abscesos, patología muy común en la EC (60).

2.4.2.3.-Histopatología

El estudio anatomopatológico en la EC tiene dos fundamentos reseñables: las características histopatológicas que orienten el diagnóstico a EII en general y a EC en particular y los hallazgos que describan la actividad aguda de la propia enfermedad.

La EC se caracteriza porque existe inflamación en todas las capas (transmural), presentando edema submucoso y úlceras que profundizan en la pared intestinal. A menudo se observan granulomas no caseificantes, siendo infrecuentes (20%) pero teniendo relativa especificidad. Estos granulomas son agregados bien definidos de histiocitos epitelioides, y muy ocasionalmente pueden presentar necrosis central, aunque una verdadera caseificación hace replantearse el diagnóstico de EC (61).

Las úlceras aftoides macroscópicas presentan una histología característica por presentarse al lado de criptas normales que no muestran ningún proceso inflamatorio ni depleción de mucina (a diferencia de lo que ocurre en la CU en la que las úlceras ocurren sobre un fondo inflamatorio considerable).

En la tabla adjunta reflejamos las diferencias más significativas a la hora del diagnóstico diferencial entre CU y EC.

	Enfermedad de Crohn	Colitis Ulcerosa
Distribución	Segmentaria	Continua
Afectación	Transmural	Mucosa
Depleción de mucina	Ocasional	Habitual
Células de Paneth	Ocasional y focal	Frecuente
Abscesos de criptas	Infrecuente	Típicos
Neutrófilos libres en lámina propia	Típico y focal	Infrecuente
Granulomas	Típicos	No presentes

Tabla 1: Diferencias entre CU y EC

2.4.2.4.- Hallazgos analíticos

Los hallazgos analíticos de un paciente con EC en actividad son los propios de una enfermedad inflamatoria activa de cualquier localización, con elevación de reactantes de fase aguda (RFA) como la proteína C reactiva, la ferritina o la VSG además de leucocitosis con predominio de neutrofilia.

La anemia es un dato muy característico de la EC y puede ser causado por la pérdida de hierro secundaria al sangrado digestivo, el déficit de B12 por malabsorción ileal o por el desarrollo de anemia de procesos crónicos inflamatorios.

En los últimos años ha cobrado importancia en el diagnóstico e incluso en el manejo de la EC la determinación en heces de la calprotectina fecal (CF). La CF es una proteína que se encuentra en células de epitelio escamoso,

polimorfonucleares, macrófagos y monocitos y que se encuentra en las heces en concentración directamente proporcional al grado de inflamación intestinal. Se utiliza actualmente para el diagnóstico diferencial entre la EII y los trastornos funcionales y, con mayor controversia, para monitorización y previsión de actividad en pacientes diagnosticados de EII. En diferentes estudios analizando pacientes sanos y otros afectados de EII se ha establecido en 200 mcg/g el punto de corte que obligue a descartar con muy alta sensibilidad la presencia de EC o CU con otras exploraciones más agresivas y caras (62–64).

2.4.3.- CLASIFICACIÓN DE LA ENFERMEDAD DE CROHN

Múltiples veces desde que se definió la EC se ha tratado de realizar una clasificación satisfactoria para la propia enfermedad. Debido a su complejidad, no ha sido hasta la clasificación de Montreal cuando se ha conseguido realizar una herramienta sencilla, integradora y que permite la definición de múltiples parámetros de la enfermedad con rapidez. Al final de la clasificación se añade una “p” si el paciente tiene o ha tenido actividad perianal. Tiene cuatro ítems a describir (65).

2.4.3.1.- Age (edad)

En este apartado se describe la edad del paciente en el momento del diagnóstico.

	Edad
A1	Menor o igual a 16 años
A2	Entre 16 y 40 años
A3	Mayor o igual a 40 años

Tabla 2: Edad al diagnóstico según la clasificación de Montreal

2.4.3.2.- Location (localización)

Se refiere a la localización en la que se ha afectado el tracto digestivo por la EC en algún momento del desarrollo de la enfermedad. Si hubiese afectación proximal al íleon terminal, se añadiría L4 a L1, L2 o L3 (L1+L4 por ejemplo).

	Localización
L1	Afectación de íleon terminal y/o ciego
L2	Afectación de colon excluyendo el ciego
L3	Afectación L1 + L2 (ileocólica)
L4	Afectación proximal a íleon terminal

Tabla 3: Localización según la clasificación de Montreal

2.4.3.3.- Behaviour (comportamiento)

El comportamiento de la enfermedad es el ítem de la clasificación de Montreal más complicado de determinar por la amplitud y posibilidad de solapamiento. Es por ello que se decidió aplicar el comportamiento más grave que un paciente haya tenido a lo largo de su evolución (penetrante, obstructiva e inflamatoria por ese orden). El patrón penetrante hace referencia a todo tipo de

perforaciones o accesos extraluminales de la enfermedad en forma de fístulas, abscesos o perforaciones libres.

	Comportamiento
B1	Inflamatorio (no penetrante ni obstructivo)
B2	Obstructivo o estenosante
B3	Penetrante

Tabla 4: Comportamiento según la clasificación de Montreal

2.5.- TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE CROHN

La EC es, como ya hemos definido previamente, una enfermedad crónica, incurable y provocada por una causa multifactorial contra la que a día de hoy no tenemos tratamiento etiológico. No obstante en estos últimos años se ha ido ampliando el arsenal médico y quirúrgico con el propósito de frenar la historia natural de la enfermedad logrando en la mayoría de los casos, un control adecuado de síntomas, actividad y complicaciones. Describimos las diferentes opciones terapéuticas por familias.

2.5.1.- GLUCOCORTICOIDES

Los glucocorticoides (GC) han sido desde hace varias décadas el pilar del tratamiento de la EC en el brote y también durante el mantenimiento. Hoy en día su uso ha quedado relegado a tratamiento de remisión de la actividad tras la generalización de otros fármacos modernos como los IMM o los tratamientos biológicos. Disponemos en el arsenal terapéutico de varios tipos de corticoides,

en función de las características de la enfermedad a tratar, su intensidad y su localización.

La budesonida oral tiene un papel importante en las formas leves de brotes de EC ileal o ileocecal. Se trata de un corticoide sintético de acción local y de baja biodisponibilidad oral por fenómeno de primer paso hepático (10%) que tras este paso forma principalmente dos metabolitos de baja actividad corticoidea: 6- β -hidroxibudesonida y 16- α -hidroxiprednisolona, por lo que consecuentemente presenta escasos efectos secundarios derivados de su actividad sistémica. La budesonida se ha mostrado más efectiva en el tratamiento del brote leve de EC limitado a íleon terminal y ciego (L1 según la clasificación de Montreal) que placebo o 5-Aminosalicílico (5-ASA), siendo de menor efectividad que los GC sistémicos clásicos. Sus efectos secundarios derivados de su naturaleza corticoidea como la decalcificación, cambios en la morfología facial o la elevación de glucemia son menos intensos que en los GC clásicos, mientras que los efectos secundarios propios más importantes son dispepsia leve o lesiones dérmicas.

Los corticoides sistémicos son principalmente la prednisona y la metilprednisolona. Son fármacos con los que se dispone de amplia experiencia en el tratamiento de brotes de EC con efectividad manifiesta aunque paralela a los efectos secundarios que potencialmente pueden producir. En el momento actual están indicados para el tratamiento del brote de EC moderado y grave de colon, de íleon y cualquier brote de localización proximal a íleon distal (66).

En relación a la respuesta de la actividad aguda de la EC a los corticoides se clasifican a los pacientes en corticorrefractarios y corticodependientes. La corticodependencia se define como aquel paciente que presenta recidiva de los síntomas de brote al disminuir la dosis de corticoides durante el tratamiento del mismo o la necesidad de dos ciclos de corticoides en brotes diferentes en menos de un año. La corticorrefractariedad es definida como aquella situación en la que no hay respuesta clínica a un brote de EC tras 14 días de corticoides intravenosos.

2.5.2.- MESALAZINAS

Las diferentes formulaciones de mesalazinas han sido ampliamente utilizadas en el tratamiento agudo del brote de EC así como en el mantenimiento de esta enfermedad. En los últimos años la utilización de esta familia de fármacos ha ido perdiendo su lugar ya que su efectividad ha sido cuestionada por varios estudios que han demostrado que ha sido superada por otras familias de fármacos como los IMM a la hora de la prevención de brotes.

En la actualidad, en las diferentes guías publicadas, el único lugar para las mesalazinas en la EC es el uso de la sulfasalazina en el tratamiento de la EC de colon en brote leve (67). La sulfasalazina es una unión de una molécula de mesalazina con una sulfapiridina que se ha mostrado efectiva en el tratamiento de la EC exclusivamente de colon ya que el enlace de las dos moléculas es roto por la flora intestinal del intestino grueso. Presenta un perfil de efectos secundarios que alcanzan a casi la mitad de los pacientes en tratamiento con este fármaco. Pueden ser dosis dependientes (cefalea, náuseas y dolor

abdominal) en relación a la molécula de sulfamida o idiosincrásicos como toxicidad hematológica, deterioro de función renal y alteración de transaminasas.

2.5.3.- INMUNOMODULADORES

Los fármacos IMM han significado un antes y un después en el manejo de la prevención de actividad aguda en la EC. Los más utilizados en la EC son los IMM tiopurínicos: la azatioprina (AZA) y la 6-mercaptopurina (6MP). Existen otros fármacos IMM también usados en la EC aunque de manera menos común: el micofenolato mofetilo y el metotrexate.

La AZA se metaboliza como profármaco tras la administración a 6MP. Su mecanismo de acción es el de inhibir la síntesis de purinas con un efecto de alteración de la fase S celular. Sus indicaciones en la EC son en el tratamiento de mantenimiento del paciente corticodependiente, la corticorrefractariedad, la prevención de la recidiva posquirúrgica y en la enfermedad perianal. Sus dosis dependen del peso y de la monitorización de la mielotoxicidad, siendo 2.5mg/kg/día la dosis óptima para la AZA y 1.5mg/kg/día la de la 6MP. Sus principales efectos secundarios son, como ya hemos adelantado, la mielotoxicidad, obligando a una monitorización estrecha de niveles de leucocitos generales, neutrófilos, linfocitos, y hematíes principalmente. En un 25% aproximadamente de pacientes generales con EC aparecen efectos secundarios hematológicos con estos fármacos, que son transitorios tras la retirada o la disminución de la dosis del fármaco. Otros efectos secundarios descritos son el aumento de infecciones víricas (en especial el citomegalovirus,

CMV), la pancreatitis aguda tóxica y efectos gastrointestinales inespecíficos. La medición de la actividad de la enzima tiopurina metil transferasa es útil en ocasiones para el manejo y el ajuste de dosis en estos pacientes (68).

El metotrexate es un fármaco cuyo mecanismo de acción consiste en la inhibición de la síntesis del ácido desoxirribonucleico mediante una disminución en la función de la dihidrofolato reductasa. Más utilizado en reumatología, su uso en la EC se reduce a pacientes con toxicidad previa a IMM tiopurínicos que imposibilite el tratamiento con los mismos. Sus efectos secundarios además de la intensa teratogenicidad (mucho mayor que la descrita en los IMM tiopurínicos) son la toxicidad hepática, hematológica y dermatológica.

2.5.4.- FÁRMACOS BIOLÓGICOS

Llamamos fármacos biológicos a anticuerpos monoclonales obtenidos de organismos biológicos. Estos fármacos son moléculas de naturaleza polipeptídica con plegamiento cuaternario estable y que tienen como antígeno específico una citoquina inflamatoria con el fin de unirse a la misma y bloquearla. De este modo, producen una ausencia de su función con una respuesta clínica posterior.

La aparición de esta familia de fármacos, de los que tenemos disponibles cuatro anti TNF- α (infliximab, adalimumab, certolizumab y golimumab) y dos anti-integrina (natalizumab y vedolizumab) ha supuesto una auténtica revolución en la terapéutica de la EC. Gracias a la terapia biológica se ha sido capaz de rescatar clínicamente a una gran parte de pacientes no

respondedores a las terapias previamente descritas, logrando evitar el uso crónico de corticoides que exponían a estos pacientes a graves efectos deletéreos.

Las indicaciones de los tratamientos biológicos son las de la EC corticorrefractaria o corticodependiente que no responde a tratamiento con IMM a dosis eficaces, así como la enfermedad con comportamiento penetrante (B3). Son fármacos que presentan una alteración marcada de la inmunidad, por lo que su perfil de efectos secundarios es muy amplio. Se han descrito reacciones infusionales (más frecuentes con infliximab), reactivaciones de tuberculosis y de hepatitis por virus de la hepatitis B y C, desarrollo de patologías autoinmunitarias latentes o infecciones por bacterias oportunistas como la *Listeria*. Por ello previamente a la instauración del tratamiento es preciso realizar un riguroso despistaje de estas patologías latentes mediante una anamnesis exhaustiva, una prueba cutánea de *Mantoux* con repetición (*booster*) posterior, una radiografía de tórax evaluada por un radiólogo experto, una determinación de serología viral completa y otra de autoanticuerpos.

2.5.5.- TRATAMIENTO ENDOSCÓPICO Y QUIRÚRGICO

Además de las diferentes moléculas con distintos mecanismos de acción de las que disponemos en la EC, en ocasiones el tratamiento médico queda superado y precisa de actuaciones endoscópicas o quirúrgicas para mejorar el curso de la enfermedad.

La endoscopia terapéutica tiene un papel importante a la hora del tratamiento de las estenosis fibrosas secundarias a actividad de EC previa. La dilatación hidroneumática de estenosis y en ocasiones la colocación de una prótesis autoexpandible son herramientas endoscópicas útiles en el desarrollo de un comportamiento B2 que pueden ser necesarias a pesar de reducir al mínimo la actividad inflamatoria con métodos farmacológicos. Sus principales riesgos son la perforación y la hemorragia digestiva.

En el caso de la cirugía ajena a la región perianal, tres técnicas son útiles en el manejo quirúrgico de la EC. La primera de ellas es la estricturoplastia, técnica que de manera similar a la dilatación endoscópica busca aumentar la luz intestinal en segmentos estenosados de causa fibrótica, no inflamatoria (69). La segunda es la resección intestinal (70). Mientras que en la CU se tiende, llegados al punto de la intervención quirúrgica, a realizar resecciones radicales como la panproctocolectomía, en la EC se tiende a retirar el mínimo segmento intestinal posible, ya que hasta un 80% de los pacientes presentan recidiva endoscópica en los bordes quirúrgicos en el primer año tras la intervención, medida por la escala de *Rutgeerts* (71).

	Hallazgos endoscópicos
Grado 0	Sin lesiones
Grado 1	Menos de 5 aftas
Grado 2	Más de 5 aftas o lesiones ulceradas a menos de 1cm de la anastomosis
Grado 3	Ileítis aftosa difusa en mucosa inflamada
Grado 4	Úlceras, nódulos o estenosis

Tabla 5: Índice endoscópico de *Rutgeers*

La última técnica quirúrgica a mencionar es el bypass intestinal, que busca excluir del tránsito intestinal un segmento afectado que no es susceptible de la resección intestinal.

2.6.- CONOCIMIENTO ACTUAL DE LA RELACIÓN ENTRE LINFOPENIA PRIMARIA Y LA ENFERMEDAD DE CROHN

En contraposición a la linfocitosis, la neutropenia o la neutrofilia, la linfopenia ha sido menos estudiada históricamente, siendo relativamente habitual el hallazgo de linfopenia (hallazgo de menos de 1.000 linfocitos por mm³ en sangre periférica) esporádica en un paciente. En la mayoría de las ocasiones no se acompaña de clínica asociada, tratándose de un hallazgo incidental y frecuentemente reversible tras la desaparición del mecanismo causal (72). La etiología de la linfopenia es muy variable y alterna enfermedades congénitas con patología adquirida. Se adjunta una tabla con las causas más frecuentes.

Infección	Bacteriana (tuberculosis, fiebre tifoidea, brucelosis...)
	Viral (VIH, sarampión...)
	Fúngica (histoplasmosis...)
	Parasitaria (paludismo...)
Inmunidad	Inmunodeficiencias primarias
Yatrogenia	Inmunosupresores (corticoides, rituximab...)
	Quimioterápicos y radioterapia
Enfermedades sistémicas	Enfermedades autoinmunes
	Linfoma
	Cáncer no hematológico
	Sarcoidosis
	Insuficiencia renal crónica avanzada
Miscelanea	Déficit de zinc
	Fuga del conducto torácico
	Anemia aplásica
	Síndrome de Cushing
	Malnutrición y alcoholismo

Tabla 6: Etiología de linfopenia

En un estudio de evaluación etiológica de linfopenia se apreció que cuando esta es secundaria, sólo permanece estable en el tiempo en el 6% de los pacientes con causas reversibles (73). Sólo cuando la linfopenia es muy marcada y además mantenida en el tiempo se relaciona con clínica, que habitualmente consiste en la aparición de enfermedades oportunistas bacterianas, fúngicas o víricas, patología inmunoalérgica (dermatitis atópica o asma por ejemplo) o desarrollo de patología maligna hematológica. En estos casos, además de la disminución en números absolutos y relativos de linfocitos, es frecuente que se asocie cierta alteración en la capacidad funcional de estas células. Las características exactas de las enfermedades asociadas a la linfopenia suelen relacionarse con el subtipo celular linfocitario más afectado.

Se ha comprobado que en ocasiones linfopenias transitorias tras infecciones víricas como gripe, rubeola, parvovirus o encefalitis del virus del Nilo han actuado como desencadenantes de patologías autoinmunitarias, mediando aspectos fisiopatológicos no bien aclarados aún (74).

La EC presenta características clínicas que pueden ser capaces por sí mismas de generar linfopenia secundaria. El uso de fármacos que afectan a la inmunidad como los tiopurínicos o los corticoides, la necesidad de cirugías resectivas sobre estos pacientes o la desnutrición proteica por la malabsorción son algunas de las causas relacionadas (75). Ahora bien, en ausencia de estos datos, existen como hemos comentado pacientes que presentan tendencia a desarrollar linfopenia primaria. Este hecho fue detectado ya en la década de los ochenta, y fue estudiado por vez única de forma sistemática en un artículo de 1986 con un tamaño muestral limitado (76).

En aquel estudio se concluía que existía un fenotipo de personas con EC y tendencia primaria a la linfopenia, estimado en torno a un 30% de pacientes. En este subgrupo se describía una mayor tendencia a ser sometido a cirugía resectiva respecto al resto de pacientes con EC. Además se evidenció que en las piezas quirúrgicas existían granulomas con mayor frecuencia. No se describió un mayor número de complicaciones posquirúrgicas en los pacientes con tendencia a la linfopenia. Obviamente fue un estudio realizado con las posibilidades terapéuticas y diagnósticas existentes en aquella década. Tras realizar una lectura crítica, se apreciaron ciertas limitaciones en la metodología, ya que el 57% de pacientes admitidos al estudio estaban bajo tratamiento

corticoideo, el 100% presentaba actividad de la enfermedad a criterio del investigador y no excluyeron pacientes con cirugía previa. Todos estos factores de confusión pudieron interferir en el recuento leucocitario de la muestra, y consecuentemente alterar los resultados posteriores. Ningún otro estudio desde entonces ha sido desarrollado para evaluar ni actualizar la relación entre EC y linfopenia.

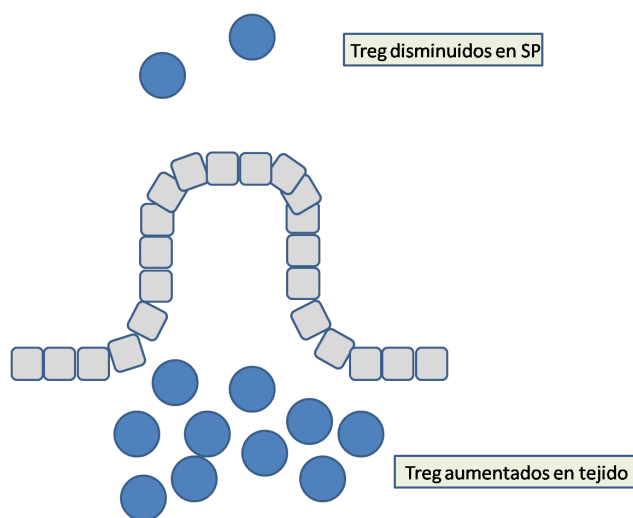
Sin embargo, la existencia de un fenotipo linfopénico sí ha sido estudiada ampliamente y demostrada en otra enfermedad granulomatosa de naturaleza autoinmunitaria: la sarcoidosis. Entre un 10% y un 26% de pacientes con sarcoidosis presentan tendencia a la linfopenia (77). Miyara et al demostró que la sarcoidosis con tendencia a la linfopenia se asocia con una importante expansión numérica de Treg (CD4+CD25+FoxP3+) disfuncionantes en pulmones y en sangre periférica (78) estableciendo lo que los autores denominaron una paradoja inmunitaria (79). Estos Treg se caracterizaron por una actividad antiproliferativa intacta que justificaba la tendencia a la linfopenia, pero con incapacidad para suprimir la actividad de los linfocitos CD4+ efectores, por lo que se producía la paradoja de mayor actividad inflamatoria pese a menor número de linfocitos CD4+. El fenotipo linfopénico se caracteriza por mayor afectación pulmonar y extrapulmonar (especialmente uveítis) de la enfermedad, que condiciona una peor evolución con refractariedad a tratamientos convencionales de la sarcoidosis (80). Existen varios estudios que relacionan el fenotipo linfopénico con una importante respuesta clínica a fármacos anti-TNF con normalización o al menos aumento de cifras absolutas de linfocitos periféricos (81). No hay a día de hoy una explicación

fisiopatológica de la mejor respuesta a estas terapias biológicas, si bien se plantea la hipótesis de que existe una respuesta primaria o secundaria de los linfocitos Treg a los fármacos anti-TNF que pudiera alterar su número o el grado de actividad (82).

En la Esclerosis Múltiple, enfermedad neurológica degenerativa de origen autoinmunitario que cursa en forma de brotes como la EC, se han descrito alteraciones funcionales de los linfocitos Treg tanto CD4+ como CD8+ en forma de alteraciones en la expresión de perforina que pueden estar en relación con su mecanismo fisiopatológico (83). En la Artritis Reumatoide también se han apreciado alteraciones en el número y función de los linfocitos Treg que son capaces de modularse por fármacos anti-TNF (84).

El potencial de las células Treg para modificar la respuesta inmunitaria por lo tanto, ha generado un considerable interés por tratarse de potenciales dianas terapéuticas en muchas enfermedades autoinmunes como hemos descrito. Estos linfocitos, de forma fisiológica, evitan el “fuego amigo” evitando la autoinmunidad y la inflamación exagerada. Su disfunción conduce a respuestas inmunitarias excesivas como la que ocurre en la EC. El ambiente inmunológico en esta enfermedad, rico en TNF- α predominantemente durante la actividad inflamatoria, puede dificultar la viabilidad y la expansión de las células Treg. Esto produciría una caída en la función de estas células.

Carlos Taxonera y col describieron un caso de un paciente con EC grave con tendencia a la linfopenia primaria y que tras tratamiento con fármacos biológicos anti-TNF (adalimumab) presentó un paulatino aumento de las cifras absolutas y relativas hasta su normalización en sangre periférica (85). Existen otros estudios en la literatura que mantienen la misma línea, apreciando que durante la actividad de la EC el número proporcional de Treg en tejido afecto está aumentado con acúmulo de los mismos predominantemente en granulomas, pero disminuido globalmente en sangre periférica (86) y que esta situación se invertía tras tratamiento con fármacos biológicos, especialmente en pacientes respondedores (87). Existen no obstante contradicciones al respecto, ya que existe un estudio en el que paradójicamente se objetivó una



disminución de Treg en los tejidos del tracto gastrointestinal afecto en niños y una respuesta a anti-TNF mediante un aumento a ese nivel de estas células (88).

Aunque en general sean todos estudios con tamaños muestrales muy limitados, estos datos nos dan pie a plantear la necesidad de nuevos estudios para tratar de aclarar hipótesis etiopatogénicas que puedan arrojar luz sobre el microuniverso inmunológico de la EC. El hecho de que exista un grupo de pacientes con EC y tendencia estable a la linfopenia primaria nos obliga a excluir una singularidad inmunológica. Esta diferente característica podría

provocar posteriormente la existencia de un fenotipo linfopénico con características clínicas, basales o de respuesta a terapia diferentes.

Por lo tanto, con la evolución geométrica que el arsenal de fármacos de los que disponemos hoy en día han experimentado, los cambios en nuestros conocimientos fisiopatológicos de la EC y la ausencia de estudios modernos, creemos que es interesante actualizar nuestro conocimiento sobre este supuesto fenotipo linfopénico con un diseño de estudio acorde a la práctica clínica habitual.

3.- ANÁLISIS BASAL Y EVOLUTIVO DE UNA COHORTE DE PACIENTES CON ENFERMEDAD DE CROHN CON TENDENCIA A LA LINFOPENIA FRENTE A OTRA COHORTE DE PACIENTES CON ENFERMEDAD DE CROHN SIN LINFOPENIA

3.1.- FUNDAMENTO E HIPÓTESIS

La EC como ya se ha descrito previamente tiene una etiología que no queda aún totalmente aclarada. Son muchos los parámetros que desconocemos en relación al trastorno inmunitario que se dan en esta enfermedad y si son causa o consecuencia, si son primarios o secundarios, respecto a la aparición y el desarrollo de esta patología.

En la práctica clínica habitual se ha determinado que existe un grupo significativo de pacientes con EC que tienen en el momento del diagnóstico una tendencia a presentar cifras absolutas y relativas de linfocitos más baja de lo habitual respecto a pacientes sanos o al resto de pacientes con EC.

El mapa inmunológico en la EC es una compleja red tridimensional en el que citoquinas proinflamatorias, proteínas antiinflamatorias, neutrófilos y múltiples subtipos de linfocitos que favorecen o suprimen el proceso inflamatorio se entremezclan de una manera que estamos aún lejos de comprender.

Gracias al importante volumen de pacientes que son seguidos en la Unidad de EII del Hospital Clínico San Carlos se ha desarrollado un estudio con el fin de

determinar si en las características basales y en la evolución de una cohorte de pacientes con ECNL y en otra cohorte de pacientes con ECTL existen diferencias que nos llevasen a pensar que exista un subgrupo fenotípico dentro de la EC que pueda presentar características propias.

Por lo tanto la hipótesis de trabajo que planteamos es si existe un fenotipo linfopénico en la EC que presente diferencias basales y divergencias evolutivas respecto al resto de pacientes con EC.

3.2.- OBJETIVOS

A la vista de la hipótesis que acabamos de plantear en el punto previo, los objetivos de este estudio deben buscar confirmar la existencia de dicho fenotipo. De confirmarse, sería de gran utilidad el poder prever en el momento del diagnóstico de un paciente con ECTL una evolución específica para individualizar el tratamiento o modificar el actual algoritmo de escalones terapéuticos y así disminuir las complicaciones de esta grave enfermedad.

Dicho esto, planteamos estos objetivos específicos:

- 1.- Cuantificar la prevalencia de pacientes con tendencia a la linfopenia primaria dentro de una población de personas con EC.
- 2.- Evaluar si existen diferencias en las características basales o evolutivas entre los pacientes ECTL frente a la cohorte ECNL.

3.- Comprobar la existencia de diferencias respecto a los efectos secundarios de fármacos IMM tiopurínicos, haciendo especial hincapié en la mielotoxicidad entre ambas cohortes.

3.3.- MATERIAL Y MÉTODOS

3.3.1.- DISEÑO, POBLACIÓN Y ÁMBITO

Se trata de un estudio retrospectivo observacional de cohortes. Se incluyeron a todos los pacientes con diagnóstico de *novο* de EC en la Unidad de Enfermedades Inflammatorias del Servicio de Aparato Digestivo entre el 1 de enero de 2001 y el 31 de diciembre de 2007 que cumplieron criterios de inclusión y exclusión. Se incluyeron asimismo los pacientes remitidos con diagnóstico de EC de otros centros durante ese periodo de tiempo, en los que se mantuvo dicho diagnóstico tras la evaluación por los facultativos de esta Unidad y que respetaban criterios de inclusión y exclusión. Se establecieron criterios de asignación de cohorte, que se exponen más adelante.

El seguimiento de ambas cohortes fue el habitual para todos los pacientes que la Unidad de EII mantiene en su práctica clínica habitual. En caso de remisión completa del paciente sin brote en los últimos 6 meses, el control clínico y analítico fue anual, en caso de brote, el seguimiento fue individualizado en función de la gravedad y las características del paciente. En el caso específico de los pacientes bajo tratamiento con IMM o biológicos, el control fue analítico cuatrimestral con evaluación clínica anual. Es importante reseñar que la Unidad de EII del Hospital Clínico San Carlos dispone de citas de acceso libre para

pacientes con síntomas sugerentes de brote que permite evitar visitas a Urgencias, por lo que la tasa de pacientes con enfermedad activa que no fueron evaluados en la Unidad es despreciable.

Se han seguido normas *Strobe* para el diseño y elaboración de este estudio (89).

3.3.2.- RECOGIDA DE DATOS Y CODIFICACIÓN

La recogida de datos ha sido mediante revisión en la sala de trabajo del Servicio de Documentación de las Historias Clínicas en soporte físico y mediante la herramienta de Historia Clínica digital de la que disponemos en el Hospital Clínico San Carlos. Esta recogida ha sido realizada íntegramente por el autor de esta obra.

La información de las Historias Clínicas se ha introducido en unas hojas de recogida de datos en formato *Access*® diseñadas *ad hoc* para este estudio en categorías (Anexo 1). La codificación a la que han sido sometidos los datos ha dependido de si son variables binarias (1: sí, 2: no), cuantitativas, o descriptivas.

3.3.3.- CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN

Para que cualquier paciente quedase aceptado para participar en este protocolo, tuvo que cumplir todos los criterios de inclusión y no presentar ningún criterio de exclusión.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Pacientes con diagnóstico de EC *de novo* realizado por un facultativo perteneciente a la Unidad de Enfermedad Inflamatoria Intestinal del Servicio de Aparato Digestivo del Hospital Clínico San Carlos entre el 1 de enero de 2001 y el 31 de diciembre de 2007. También se incluyeron aquellos pacientes que entre las fechas señaladas fueron remitidos a dicha Unidad con diagnóstico de EC realizado en otro centro, pero corroborado por los facultativos de la Unidad si cumplieron el resto de requisitos exigibles para los pacientes diagnosticados de inicio.
- Pacientes que han mantenido un seguimiento regular (el señalado por los facultativos de la Unidad) y exclusivo por parte de ésta a lo largo de 6 años desde el diagnóstico o la llegada a la Unidad acudiendo a todas las citas de revisión y a las exploraciones complementarias (analíticas o de otra índole) que se les indicó.
- Adecuada adherencia terapéutica a los tratamientos y las órdenes médicas dadas a lo largo de ese seguimiento.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Pacientes que han sido sometidos a cirugía abdominal que afectara a cualquier segmento de colon, intestino delgado o estómago antes de la llegada a la Unidad de EII. También fueron excluidos aquellos pacientes

que previamente al diagnóstico hubieran sido sometidos a drenaje no quirúrgico de colecciones o abscesos intraabdominales.

- Enfermos que en el momento del diagnóstico o, en el caso de haber sido remitidos por otros centros, al ser valorado por la Unidad se encuentren en tratamiento activo con fármacos IMM, biológicos u otras drogas potencialmente mielotóxicas.
- Presentar positividad para anticuerpos frente al virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o estar diagnosticados de alguna enfermedad inmunológica.
- Presentar en el momento del diagnóstico o durante el tiempo de seguimiento enfermedad oncológica activa.
- No cumplir todos los criterios de inclusión.

3.3.4.- CRITERIOS DE ASIGNACIÓN DE COHORTE

Para asegurarnos que todo paciente que se incluyó en la cohorte de pacientes ECTL fuera realmente un paciente con tendencia a presentar una linfopenia primaria se desarrollaron unos criterios de alta exigencia que buscaron excluir de esta cohorte aquellos pacientes que pudieran generar dudas por encontrarse en posiciones intermedias. Los criterios de inclusión para esta cohorte ECTL son:

1. Disponer de al menos 6 análisis de sangre en situación de remisión clínica de la EC según Historia Clínica, en ausencia de fármacos IMM, terapia biológica o fármacos que presenten un potencial efecto mielotóxico en su ficha técnica. Entre el primer análisis de sangre y el último debe haber al menos nueve meses.
2. No presentar trombopenia o neutropenia asociada en ninguna evaluación analítica en la que se presente linfopenia.
3. Presentar en al menos dos momentos de su evolución cifras absolutas de linfocitos menores a 1100 células/mm³.
4. No superar la cifra de 1500 linfocitos/ mm³ en más de un control analítico, y no superar en ningún caso los 1700 linfocitos/ mm³.

De cumplirse estas condiciones, el paciente queda incluido en la cohorte ECTL. De no cumplirse, el paciente se introduce en la cohorte de ECNL.

3.3.5.- VARIABLES DE ESTUDIO

A continuación describimos todas las variables incluidas en este estudio para ser luego analizadas posteriormente.

- Edad: La edad en números enteros del paciente en el momento del diagnóstico de la EC en la Unidad de EII o si es remitido desde otro centro, por el facultativo responsable en aquel momento.
- Sexo: 1: hombre. 2: mujer.

- Fumador: hábito tabáquico activo o previo del paciente en el momento del diagnóstico (0: nunca fumador. 1: fumador en activo. 2: exfumador desde hace más de 3 meses).
- A (*Age*): 1: la edad al diagnóstico es igual o menor a 16 años. 2: la edad al diagnóstico se sitúa entre 17 y 40 años. 3: la edad al diagnóstico es igual o mayor de 41 años.
- L (*Location*): 1: EC que afecta a íleon terminal y/o ciego. 2: EC que afecta al resto de porciones del colon. 3: EC que afecta a la vez a localizaciones de L1 y L2. 4: EC que afecta a localizaciones proximales a íleon terminal.
- B (*Behaviour*): 1: patrón inflamatorio de la EC (aquel que no es B2 ni B3). 2: obstructivo: aquel patrón de comportamiento que genera a lo largo del seguimiento cuadros obstructivos o suboclusivos ya sean de naturaleza inflamatoria o fibrosa. 3: patrón penetrante es aquel que en su seguimiento genera fístulas enteroentéricas, enterovesicales, enterocutáneas o enterovesicales; colecciones o abscesos intraabdominales así como perforaciones intestinales con peritonitis secundarias. En el caso de comportamientos límites entre B2 y B3, el comportamiento será descrito como B3.
- Perianal: se definirá como afectación perianal si en el seguimiento descrito alguno de los facultativos especialistas de la Unidad realiza el

diagnóstico de afectación perianal en relación a la EC independientemente del tratamiento posterior (1: sí. 2: no).

- Articular: se definirá componente articular si en el seguimiento descrito alguno de los facultativos especialistas de la Unidad realiza el diagnóstico de artropatía asociada a EII o en su defecto, el diagnóstico es realizado por el Servicio de Reumatología con conformidad de dichos especialistas (1: sí. 2: no).
- Linfocitos absolutos: se trata del valor medio de todas las determinaciones de linfocitos en números absolutos disponibles extraídas en periodos de remisión según Historia Clínica en ausencia de infecciones, VIH, fármacos IMM o terapias biológicas. Según se ha detallado previamente en la de criterios de inclusión y exclusión (Apartado 3.3.3), la media debe ser al menos de 6 determinaciones analíticas válidas.
- Linfocitos relativos: se trata del valor medio de todas las determinaciones de linfocitos relativos disponibles extraídas en periodos de remisión según Historia Clínica en ausencia de infecciones, VIH, fármacos IMM o terapias biológicas. Según se ha detallado previamente en la de criterios de inclusión y exclusión (Apartado 3.3.3), la media debe ser al menos de 6 determinaciones analíticas válidas.

- IMM: se describe como la necesidad de presentar en algún momento de la evolución el tratamiento con IMM tiopurínicos: AZA o 6MP (1: sí. 2: no). El tratamiento debe ser pautado por miembros de la Unidad, con las dosis iniciales y manejo de la práctica clínica habitual.
- Duración de la enfermedad hasta inicio de IMM: es el tiempo medido en meses desde el diagnóstico de la enfermedad o la admisión en la Unidad si el diagnóstico ha sido realizado en otro centro, hasta el inicio del tratamiento con IMM tiopurínicos.
- Mielotoxicidad: se describe como la necesidad de suspender el tratamiento o de disminuir la dosis al menos 50mg diarios respecto a dosis previas en pacientes bajo tratamiento con IMM tiopurínicos (1: sí. 2: no modificación).
- Reacción frente a la mielotoxicidad: suspensión total del fármaco o reducción de dosis del mismo para alcanzar nuevamente valores dentro de parámetros hematológicos de seguridad a criterio del facultativo de la Unidad de EII (1: suspensión del fármaco. 2: disminución de la dosis).
- Linfocitos en la mielotoxicidad: número de linfocitos absolutos que estuvieron presentes cuando se produjo la disminución de dosis o la retirada del IMM tiopurínico.

- Linfocitos relativos en la mielotoxicidad: esta variable es el porcentaje de linfocitos (por lo tanto relativos) que están presentes cuando se produce la disminución o la retirada del IMM tiopurínico.
- Pancreatitis: se describe como haber presentado un episodio de pancreatitis aguda que haya precisado ingreso o valoración en digestivo y que, tras descartar otras causas, su etiología haya sido relacionada con la ingesta de IMM tiopurínicos (1: sí. 2: no).
- Complicaciones infecciosas: se valorarán como complicaciones infecciosas que los facultativos de la Unidad de EII hayan relacionado con el tratamiento con IMM tiopurínicos y haya motivado el suspender el fármaco.
- Fármacos biológicos: describimos esta variable como la necesidad de alcanzar en algún momento de la evolución el tratamiento con fármacos biológicos (1: sí. 2: no).
- Duración de la enfermedad hasta inicio de fármacos biológicos: es el tiempo medido en meses desde el diagnóstico de la enfermedad o la admisión en la Unidad si el diagnóstico ha sido realizado en otro centro, hasta el inicio del tratamiento con terapia biológica.
- Complicaciones: consiste en la descripción por parte de alguno de los facultativos de la Unidad de existencia de complicaciones de cualquier

índole que obliguen a la suspensión al menos temporal del tratamiento biológico (1: sí 2: no). Adyacente se describe en qué ha consistido la complicación.

- Cirugía: esta variable describe si el paciente ha requerido durante el seguimiento de algún acto quirúrgico abdominal de naturaleza resectiva (ajeno a la enfermedad perianal) como tratamiento de su EC (1: sí 2: no). Adyacente se describe el tipo de intervención.
- Duración de la enfermedad hasta cirugía resectiva: tiempo medido en meses desde el diagnóstico de la enfermedad o la admisión en la Unidad si el diagnóstico ha sido realizado en otro centro, hasta la fecha de la intervención quirúrgica resectiva.
- Granulomas: presencia o no de estructuras granulomatosas en la pieza de la resección quirúrgica de los pacientes que durante el seguimiento fueran sometidos a dicha técnica quirúrgica.

3.3.6.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó un análisis descriptivo de la distribución de la población de estudio según todas las variables que se consideraron relevantes (edad, sexo, subtipos de la EC según Montreal, cirugía, tratamiento con IMM o biológicos, recuento y porcentaje de linfocitos...).

Para describir las variables, cuando fueron categóricas se utilizó la proporción y se compararon entre ellas utilizando el test de X^2 . Cuando fueron continuas se utilizó la media como estadístico de centralización y la desviación estándar como estadístico de dispersión o la mediana y el rango intercuartílico (RIC: P25-P75) y se compararon utilizando el test paramétrico t de Student.

Los estudios de supervivencia se llevaron a cabo por el método de Kaplan-Meier comparando los grupos por medio del estadístico Log-rank y asumiendo que había una diferencia significativa si $p \leq 0,05$.

Los cálculos se llevaron a cabo con el paquete estadístico para Microsoft Windows SPSS versión 22 (Chicago, IL, USA).

3.4.- RESULTADOS

3.4.1.- PACIENTES INCLUIDOS EN EL ESTUDIO

El total de pacientes nuevos que fueron valorados en la Unidad de Enfermedades Inflamatorias Intestinales desde el 1 de enero de 2001 hasta el 31 de diciembre de 2007 ascendió a 205. Se solicitaron todas las historias clínicas de estos pacientes obteniendo un total de 197. Ocho pacientes se excluyeron del estudio porque no fue posible la localización de sus historias clínicas a lo largo de la fase de recogida de datos de este estudio (2 meses).

Se aplicaron los criterios de inclusión y exclusión a los 197 pacientes restantes. Se descartaron 53 pacientes por causas diversas que a continuación definimos:

- Diagnóstico no corroborado por facultativos de la Unidad: 6 pacientes
- Pérdida de seguimiento a lo largo del estudio: 9 pacientes
- Cirugía abdominal previa: 21 pacientes
- Tratamiento activo con IMM, biológicos o con algún fármaco potencialmente mielotóxico: 11 pacientes.
- No disponibles suficientes datos analíticos previos a tratamiento con IMM, biológicos o cirugía: 4 pacientes.
- Enfermedad oncológica activa: 2 pacientes.

Tras retirar a estos 53 pacientes, se obtuvieron 144 pacientes a los que se aplicaron los criterios de selección de cohorte. Con estos criterios de asignación, la cohorte de pacientes ECNL presentó un tamaño definitivo de 115 pacientes (79,87%) mientras la cohorte de ECTL fue compuesta por un total de 29 pacientes (20,13%).

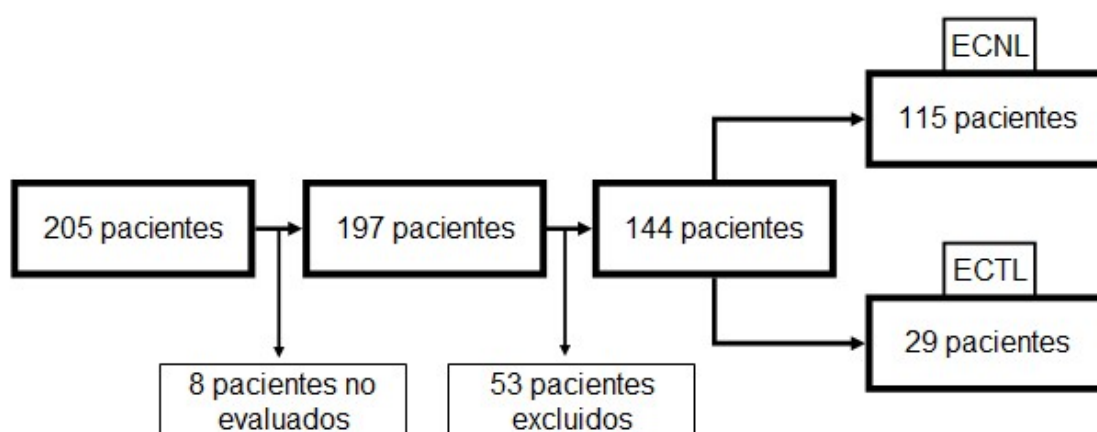


Figura 2: Diagrama de flujo de pacientes incluidos en el estudio

3.4.2.- ANÁLISIS DE LAS CARACTERÍSTICAS BASALES

En lo relativo al análisis de las características basales sexo, edad al diagnóstico y la prevalencia de tabaquismo activo o pasado, se concluyó que no había diferencias estadísticamente significativas entre las mismas. Según los criterios de Montreal, tampoco se apreciaron diferencias entre las localizaciones de la enfermedad (L1, L2 y L3).

Respecto al parámetro edad, la cohorte ECTL presentó mayor tasa de pacientes con diagnóstico inicial en edades más tardías de 40 años (A3) respecto al grupo ECNL (13/29 [44.8%] vs 29/115 [25.2%] respectivamente; $p=0.03$). No hubo diferencias significativas en los otros dos grupos de edad entre ambas cohortes.

Características basales		Total		ECNL		ECTL		p	Odds Ratio	IC95% OR	
		Nº de casos	%	Nº de casos	%	Nº de casos	%				
Sexo	Hombre	63	44,1%	48	42,1%	15	51,7%	0,35	1,47	0,65	3,34
	Mujer	80	55,9%	66	57,9%	14	48,3%	1	1		
Tabaco	No fumador	52	39,1%	40	37,7%	12	44,4%	0,78	1		
	Fumador	62	46,6%	51	48,1%	11	40,7%	0,48	0,71	0,29	1,8
	Ex fumador	19	14,3%	15	14,2%	4	14,8%	0,86	0,89	0,25	3,19
Age	A1	6	4,2%	4	3,5%	2	6,9%	0,07	1		
	A2	95	66,4%	81	71,1%	14	48,3%	0,91	1,12	0,18	6,88
	A3	42	29,4%	29	25,4%	13 *	44,8%	0,03	0,39	0,16	0,92
Location	L1	80	55,9%	62	54,4%	18	62,1%	0,81	1,13	0,44	2,87
	L2	24	16,8%	21	18,4%	3	10,3%	0,42	0,55	0,13	2,33
	L3	39	27,3%	31	27,2%	8	27,6%	1	1		

* $p<0.05$

Tabla 7: Características basales

Se apreciaron diferencias significativas tras agrupar los otros dos segmentos de edad (A1+A2) y enfrentándolos a A3. La cohorte ECTL presentó mayor tasa de pacientes A3 respecto a A1+A2 (OR 2.38, IC95%: 1.02-5.54; p=0.04).

	Total		ECNL		ECTL		p	Odds Ratio	IC95% OR	
	Nº de casos	%	Nº de casos	%	Nº de casos	%				
A1+A2	101	70,6%	85	74,6%	16	55,2%	0,044	1		
A3	42	29,4%	29	25,4%	13*	44,8%		2,381	1,023	5,541

*p<0.05

Tabla 8: Diferencias entre A3 y A1+A2

En lo relativo al conteo hematimétrico de linfocitos entre ambas cohortes, se obtuvieron diferencias significativas respecto al número medio, absoluto y relativo, de linfocitos entre ambas cohortes con p<0.001.

	ECNL						ECTL						p
	Válido N	Media	DE	Mediana	P25	P75	Válido N	Media	DE	Mediana	P25	P75	
Linfocitos	114	2304	476	2300	2000	2500	29	1152	166	1100	1100	1300	<0,001
%Linfocitos	114	30	6	30	25	34	29	19	4	18	17	22	<0,001

Tabla 9: Diferencias entre valores de linfocitos

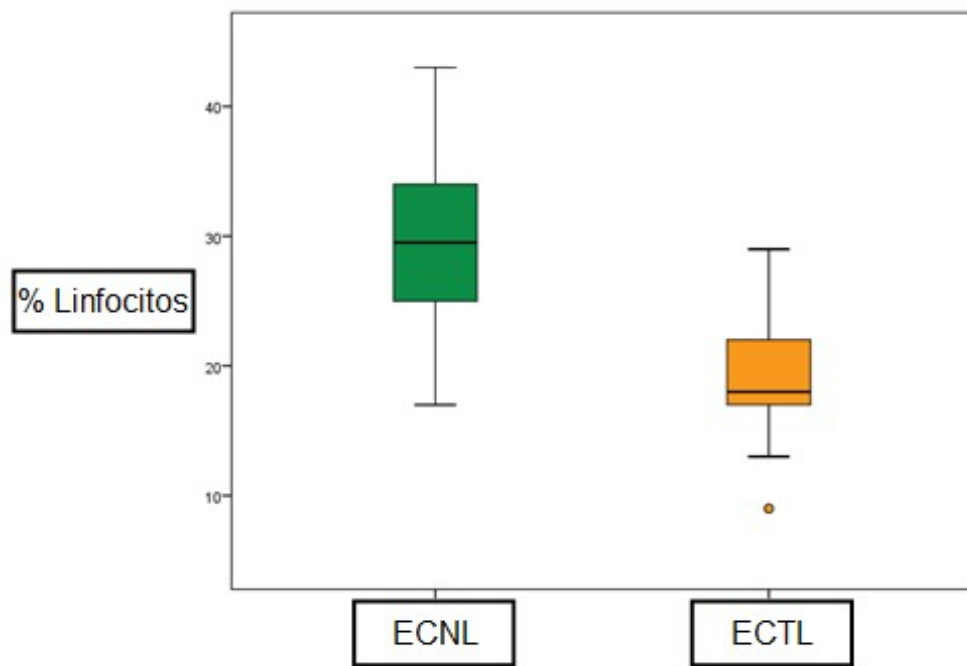


Figura 3: Diferencias en los linfocitos relativos

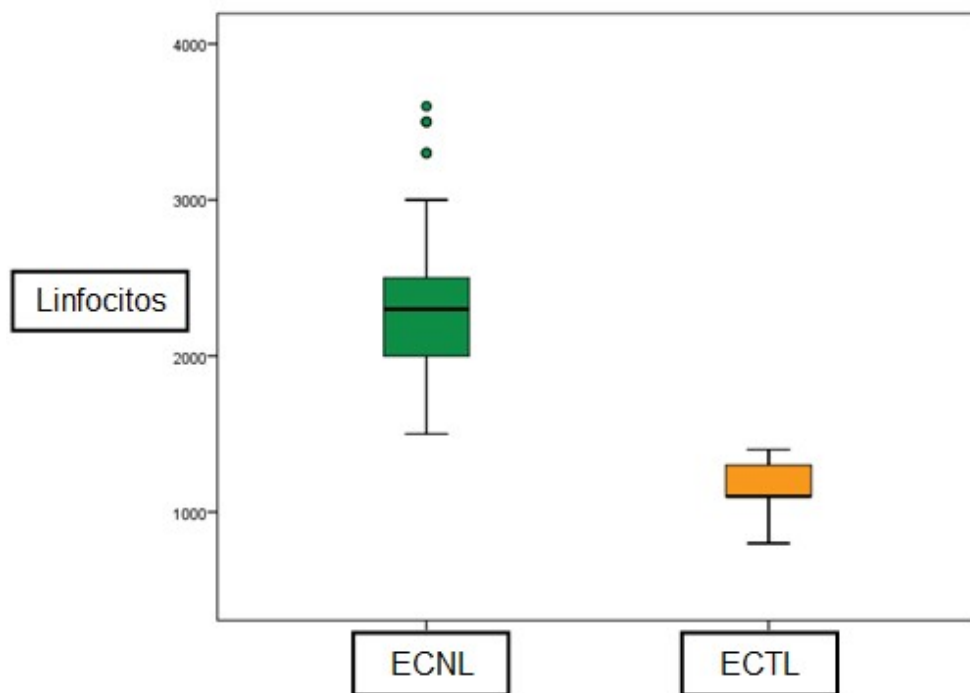


Figura 4: Diferencias en los linfocitos absolutos

3.4.3.- ANÁLISIS DURANTE LA EVOLUCIÓN DE LAS COHORTES

Como se ha descrito previamente, se analizaron las diferentes variables durante la evolución del seguimiento de las dos cohortes. A continuación se describen los resultados.

No se objetivaron diferencias estadísticamente significativas respecto al patrón de comportamiento de la EC de acuerdo a la clasificación de Montreal. No obstante se apreció una tendencia a favor de que los pacientes de la cohorte de ECTL presentaran una tasa mayor de formas penetrantes (OR 1.61, IC 95%: 0.75-3.54; $p=0.24$). Al agrupar los patrones inflamatorio (B1) y obstructivo (B2) y enfrentarlos al comportamiento penetrante, la tendencia fue aún más manifiesta (OR 2.42, IC95%: 0.84-6.99; $p=0.1$).

	B1	B2	B3	Total
ECNL	89 (78.1%)	8 (7.0%)	17 (14.9%)	114
ECTL	20 (69%)	2 (6.9%)	7 (24.1%)	29
Total	109 (76%)	10 (7.0%)	24 (16.8%)	143

$p=0.24$

Tabla 10: Diferencias entre B1, B2 y B3.

	B1+B2	B3	Total
ECNL	97 (85.1%)	17 (14.9%)	114
ECTL	22 (75.9%)	7 (24.1%)	29
Total	119 (83.2%)	24 (16.8%)	143

p=0.1

Tabla 11: Diferencias entre B1+B2 y B3.

No se hallaron diferencias significativas respecto a la afectación perianal y a la presencia de artropatía asociada a EII durante el periodo de seguimiento.

	No perianal	Perianal	Total
ECNL	99 (86.8%)	15 (13.2%)	114
ECTL	26 (89.7%)	3 (10.3%)	29
Total	125 (87.4%)	18 (12.6%)	143

p=0.69

Tabla 12: Diferencias en la afectación perianal

	No artropatía	Artropatía	Total
ECNL	82 (71.9%)	32 (28.1%)	114
ECTL	23 (79.3%)	6 (20.7%)	29
Total	105 (73.4%)	38 (26.6%)	143

p=0.42

Tabla 13: Diferencias en la artropatía asociada a EII

Tampoco se apreciaron diferencias estadísticamente significativas entre ambas cohortes respecto a las variables de precisar o no tratamientos con fármacos IMM o biológicos.

	No IMM	Sí IMM	Total
ECNL	40 (35.1%)	74 (64.9%)	114
ECTL	13 (44.8%)	16 (55.2%)	29
Total	53 (37.1%)	90 (62.9%)	143

p=0.33

Tabla 14: Diferencias entre tasas de tratamiento con IMM

	No biológicos	Biológicos	Total
ECNL	84 (73.7%)	30 (26.3%)	114
ECTL	24 (82.8%)	5 (17.2%)	29
Total	108 (75.5%)	35 (24.5%)	143

p=0.31

Tabla 15: Diferencias entre tasas de tratamiento con fármacos biológicos

En el grupo de pacientes de la cohorte de ECNL 12 pacientes precisaron cirugía resectiva durante el seguimiento. Se practicaron 11 resecciones de íleon terminal y una hemicolectomía derecha con anastomosis ileocólica. En la

cohorte de pacientes ECTL, 7 pacientes precisaron resección quirúrgica, siendo todas las cirugías resecciones ileales.

	No cirugía	Cirugía	Total
ECNL	102 (89.5%)	12 (10.5%)	114
ECTL	22 (75.9%)	7 (24.1%)	29
Total	124 (86.7%)	19 (13.3%)	143

p=0.05

Tabla 16: Diferencias en las tasas de tratamiento quirúrgico

En la evaluación de la estimación de riesgo, los pacientes de la cohorte de ECTL tuvieron una tasa significativamente mayor de cirugía comparados con los de ECNL con un OR de 2.07 y un intervalo de confianza al 95% entre 1.03 y 4.18 (p=0.05).

	Estimación de riesgo		
	Valor	Intervalo de confianza de 95 %	
		Inferior	Superior
Odds ratio para Cirugía (ECNL / ECTL)	2,07	1,03	4,18

Tabla 17: Estimación de riesgo de cirugía resectiva

Se apreciaron granulomas en 3 pacientes de la cohorte ECTL de los 7 pacientes que fueron sometidos a cirugía de esa cohorte (42.86%). En el grupo

de pacientes ECNL, de las 12 resecciones quirúrgicas 4 presentaron granulomas en el estudio anatomopatológico (33.33%). No se describieron diferencias significativas entre los resultados de ambas cohortes tras aplicar el test de Fisher ($p=1$) por el limitado tamaño muestral.

	No granulomas	Granulomas	Cirugías totales
ECNL	9 (66.66%)	3 (33.33%)	12
ECTL	3 (57.14%)	4 (42.86%)	7

$p=1$

Tabla 18: Diferencias en la aparición de granulomas en piezas quirúrgicas

Se objetivó que los pacientes de la cohorte de ECTL tuvieron una tasa significativamente mayor de mielotoxicidad comparados con los del grupo ECNL (OR 35.75, IC95% 8.35-153.03; $p>0.001$).

			Linfopénico		Total
			ECNL	ECTL	
Mielotoxicidad	No	Recuento	66	3	69
		% dentro de Mielotoxicidad	95,70%	4,30%	100,00%
	Sí	Recuento	8	13	21
		% dentro de Mielotoxicidad	38,10%	61,90%	100,00%
Total		Recuento	74	16	90
		% dentro de Mielotoxicidad	82,20%	17,80%	100,00%

Tabla 19: Diferencias en la mielotoxicidad

Se subdividieron los pacientes de ambas cohortes que habían presentado mielotoxicidad en función de si habían precisado suspensión del fármaco tiopurínico o si una reducción de la dosis había sido suficiente para recuperar valores hematológicos normales. De los 16 pacientes de la cohorte ECTL, el manejo mediante suspensión total del fármaco fue necesario en 4 pacientes (25.00%), mientras que la reducción de la dosis fue suficiente en 9 de ellos (56.3%). En el grupo de los 74 pacientes con ECNL, se suspendió el tratamiento en 4 pacientes (5.4%) y se redujo la dosis en otros 4 (5.4%). Se apreciaron diferencias significativas entre ambas cohortes respecto a la suspensión del fármaco con $p=0.03$ (aplicando corrección de Fisher). El *Risk Ratio* fue 4,62 (1,29-16,57). En el caso de la reducción de dosis, también se alcanzó la significación estadística en las diferencias halladas entre las cohortes con $p<0.001$ (aplicando corrección de Fisher). El *Risk Ratio* fue 10,41 (3,65-29,63) a favor de la cohorte de pacientes con ECTL.

	Con IMM	Mielotoxicidad con retirada	Mielotoxicidad con bajada de dosis
ECTL	16	4 (25%)	9 (56.3%)
ECNL	74	4 (5.4%)	4 (5.4%)
Total	90	8	13

Tabla 20: Modificación de dosis o suspensión del IMM en la mielotoxicidad

Respecto a los análisis de efectos secundarios de fármacos IMM ajenos a la mielotoxicidad, no se apreciaron diferencias significativas entre ambas cohortes. Se describieron 3 episodios de pancreatitis agudas en la cohorte

ECNL mientras que no hubo ningún episodio en el grupo ECTL. En todos los casos se trataron de pancreatitis sin criterios de gravedad clínicos, analíticos o radiológicos.

	No Pancreatitis	Pancreatitis	Total
ECNL	111 (97.3%)	3 (2.7%)	114
ECTL	29 (100%)	0 (0%)	29
Total	140 (97.9%)	3 (2.1%)	143

p=0.38

Tabla 21: Diferencias en la aparición de pancreatitis aguda en pacientes en tratamiento con IMM

No se describieron complicaciones infecciosas (víricas o bacterianas que produjesen sepsis de manera ajena a la propia EC) o elevación de transaminasas relevantes en la cohorte de ECTL. Hubo dos complicaciones infecciosas en el grupo ECNL. Se describió una aparición de *novo* de Herpes Zoster que presentó buena evolución sin tratamiento antiviral y un desarrollo de papilomas cutáneos en relación a VPH con buena respuesta a tratamiento tópico.

3.4.4.- ANÁLISIS MEDIANTE CURVAS DE SUPERVIVENCIA

Se realizaron análisis para valorar la probabilidad acumulada de evitar el tratamiento con IMM, con fármacos biológicos y con cirugía durante el periodo de seguimiento del estudio. Para ello utilizamos análisis de supervivencia.

No se objetivaron diferencias significativas en la probabilidad de necesitar tratamiento con fármacos biológicos entre ambas cohortes (HR 0.69, IC95%: 0.27-1.79; p=0.45).

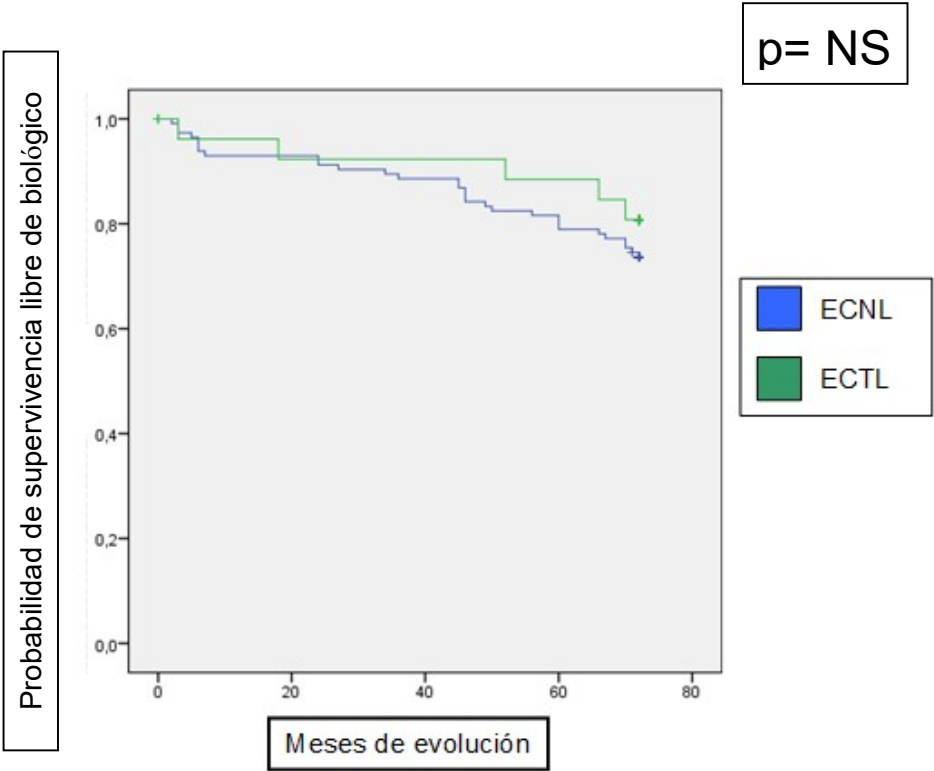


Figura 5: Proporción de pacientes que evitaron el tratamiento con fármacos biológicos durante el seguimiento.

	N total	N de eventos	N	Porcentaje
ECNL	114	30	84	73,7%
ECTL	28	5	23	82,1%
Global	142	35	107	75,4%

	Media			
	Estimación	Error estándar	Intervalo confianza de 95 %	
			Límite inferior	Límite superior
ECNL	63,246	1,831	59,658	66,834
ECTL	66,192	3,273	59,778	72,607
Global	63,793	1,613	60,632	66,954

	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	0,579	1	0,447

Tabla 22: Probabilidad acumulada de tratamiento con biológicos.

A continuación se analizó la posibilidad de iniciarse tratamiento con IMM durante los 6 años de seguimiento. No se apreciaron diferencias significativas entre ambos grupos al analizar la probabilidad acumulada de necesitar tratamiento con fármacos IMM (HR 0.72, IC95% 0.42-1.23; p=0.23).

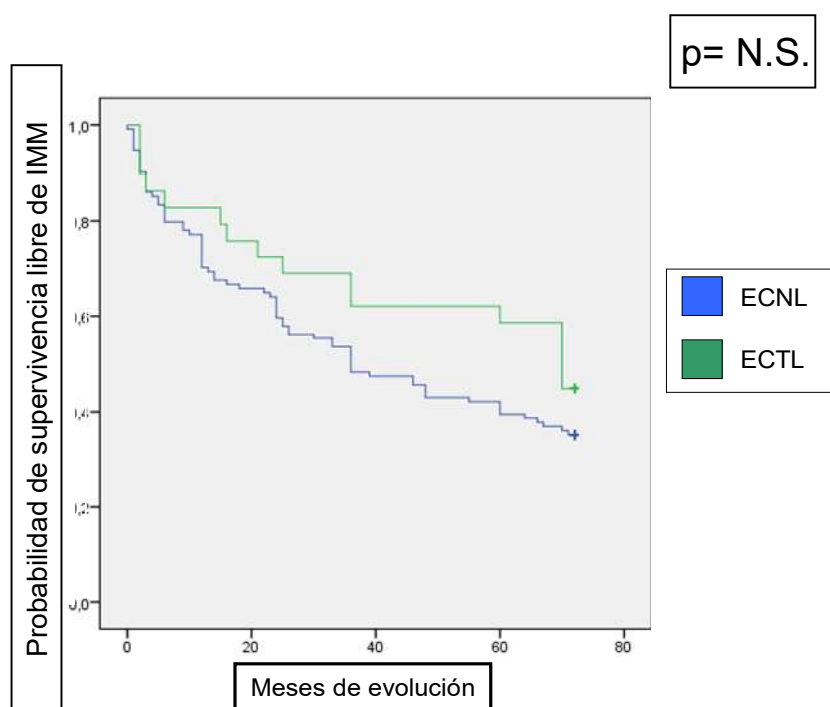


Figura 6: Proporción de pacientes que evitaron el tratamiento con fármacos IMM durante el seguimiento.

	N total	N de eventos	N	Porcentaje
ECNL	114	74	40	35,1%
ECTL	29	16	13	44,8%
Global	143	90	53	37,1%

	Media			
	Estimación	Error estándar	Intervalo de confianza de 95 %	
			Límite inferior	Límite superior
ECNL	40,123	2,681	34,869	45,377
ECTL	49,655	5,262	39,342	59,968
Global	42,056	2,410	37,332	46,780

	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	1,495	1	0,221

Tabla 23: Probabilidad acumulada de tratamiento con IMM.

Se evaluó la posibilidad de precisar cirugía durante el seguimiento. Los pacientes del grupo ECTL tuvieron una probabilidad aumentada de ser sometidos a cirugía resectiva durante el seguimiento respecto a los pacientes ECNL (HR 2.73, IC95% 1.07-6.93; p=0.03).

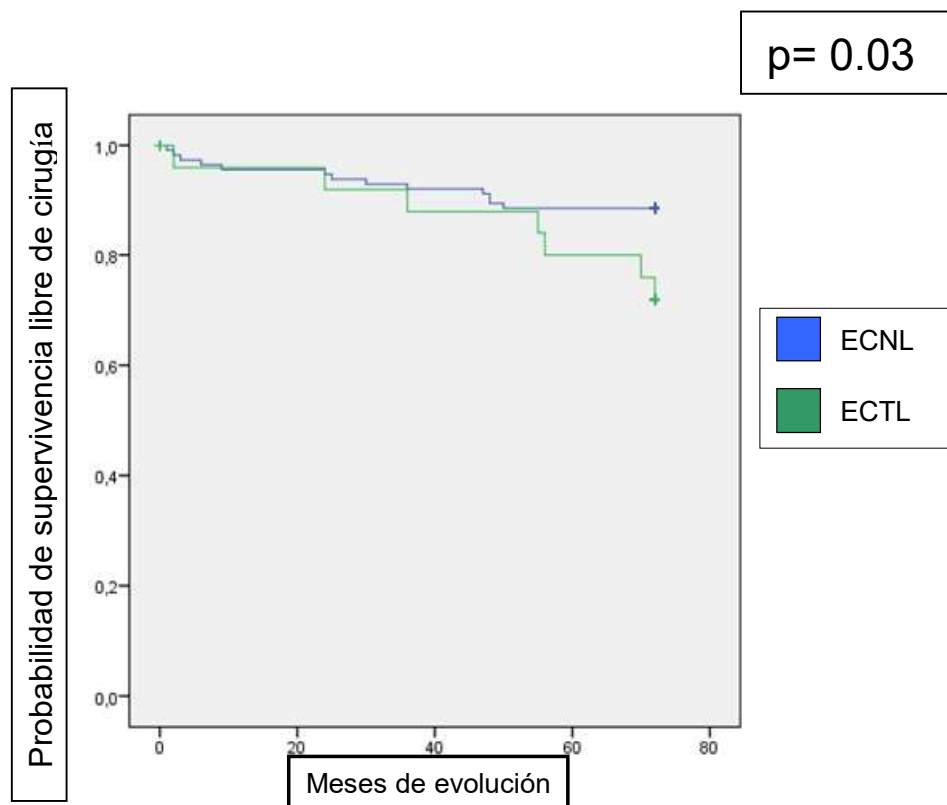


Figura 7: Proporción de pacientes que evitaron cirugías resectivas durante el seguimiento.

	N total	N de eventos	N	Porcentaje
ECNL	114	13	101	88,6%
ECTL	29	7	22	75,9%
Global	143	20	123	86,0%

	Media			
	Estimación	Error estándar	Intervalo de confianza de 95 %	
			Límite inferior	Límite superior
ECNL	66,675	1,510	63,716	69,635
ECTL	64,440	3,772	57,048	71,832
Global	66,273	1,427	63,477	69,069

	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	4,189	1	0,03

Tabla 24: Probabilidad acumulada de cirugía resectiva.

3.5.- DISCUSIÓN

En el presente estudio se analiza una cohorte de pacientes con diagnóstico de EC con el fin de identificar aquellos que presentando esta enfermedad asociaron tendencia a linfopenia primaria. Una vez identificados, se procedió a la creación del grupo ECTL mediante estrictos criterios de selección de cohorte y se evaluaron las diferencias basales y evolutivas de este grupo respecto al resto de pacientes con ECNL. En la literatura científica son muy escasos los estudios que evalúan a pacientes con EC y tendencia a linfopenia primaria (76).

En nuestro conocimiento actual, este estudio es el primero que ha evaluado diferencias entre una cohorte de pacientes con ECTL y otro grupo de pacientes sin dicha tendencia. Se establecieron unos criterios muy rigurosos de asignación de cohortes, tratando de evitar problemas metodológicos en la asignación de los pacientes en los diferentes grupos. Así, para evitar una heterogeneidad en la muestra de pacientes de la cohorte ECTL, se tomaron

criterios muy estrictos para evitar la inclusión de pacientes intermedios o “*borderline*” que no presentaran una clara tendencia a la linfopenia. Esta selección estricta, a pesar del riesgo de disminuir el tamaño muestral de la cohorte ECTL aseguró una mayor calidad metodológica en los resultados.

A pesar de tratarse de un estudio unicéntrico y de la relativa baja incidencia de la EC, se ha conseguido incluir un número apreciable de pacientes en el estudio durante un intervalo de seis años. Tras aplicar los criterios de inclusión y exclusión y los de asignación de cohortes, se incluyeron finalmente 115 pacientes para la cohorte ECNL y 29 para la ECTL. El 20.13% de los pacientes presentaron criterios de tendencia a la linfopenia primaria. El presente estudio ha confirmado la existencia de un subgrupo de pacientes con EC que tienen como característica diferencial una tendencia a la linfopenia no ocasional, duradera y estable en el tiempo. En un estudio previo, la proporción de pacientes con tendencia a linfopenia fue algo superior (alrededor del 30%), si bien los criterios seguidos para definir esta tendencia fueron mucho menos estrictos que en este trabajo (76) ya que se aceptaron pacientes con actividad prolongada de la enfermedad o bajo tratamientos activos muy duraderos con corticoides, capaces de afectar al recuento linfocitario y de aumentar la proporción de pacientes con linfopenia.

No se objetivaron diferencias significativas en el análisis de las características basales entre cohortes en lo relativo a la localización de la enfermedad. En los pacientes ECTL y en los ECNL, la localización L1, exclusivamente ileal fue la predominante con un 62.1% y un 54,4% de los casos respectivamente. Este

dato es algo superior a lo descrito en la literatura actual (90,91) que se sitúa entre un 30% y un 40% en estudios con mayores tamaños muestrales. No se apreciaron diferencias entre grupos respecto al resto de localizaciones. Tampoco se objetivaron diferencias entre cohortes respecto al sexo y al hábito tabáquico, estando estos datos en correlación con estudios epidemiológicos de nuestro entorno (92).

La edad al diagnóstico sí se presentó como elemento diferenciador entre ambas cohortes. En los pacientes ECTL se objetivó una diferencia significativa a favor del debut de la enfermedad en pacientes de mayor edad. Se apreció que la tasa de pacientes con debut más allá de los 40 años de edad (A3 de Montreal) es significativamente mayor en el grupo ECTL (44.8%) frente al grupo ECNL (25.4%). Esto es un primer hecho diferenciador de la cohorte ECTL ya que estos pacientes de inicio tardío de la enfermedad tienen una evolución diferente del resto de pacientes diagnosticados en edades más tempranas (93–95).

En el análisis evolutivo de las cohortes no se han apreciado diferencias entre cohortes en lo relativo a la expresión clínica según los criterios de Montreal. El patrón penetrante, el más asociado a complicaciones, fue el que presentó un 24.1% de los pacientes ECTL frente a un 16.8% del grupo no linfopénico. Se objetivó una tendencia a una mayor tasa de fenotipo penetrante (B3 de Montreal) en la cohorte de pacientes ECTL frente al grupo no linfopénico ($p=0.18$). Con respecto a la presencia durante los seis años de seguimiento de

artropatía asociada a EII y de enfermedad perianal no se objetivaron diferencias entre ambas cohortes.

En el momento actual la práctica clínica es flexible en lo referente al inicio de fármacos IMM o moléculas biológicas en pacientes en los que aunque no cumplan criterios de corticodependencia o corticorrefractariedad presenten características predictoras de una mala evolución (96,97). Por ello cada vez hay más pacientes bajo tratamiento con IMM tiopurínicos que precisan de controles periódicos para descartar complicaciones derivadas de la mielotoxicidad (98,99). En este estudio no se han observado diferencias entre ambos grupos respecto a la necesidad de iniciar tratamiento con IMM entre ambas cohortes. Durante los seis años de seguimiento desde el diagnóstico, un 55.2% de pacientes ECTL iniciaron tratamiento con IMM frente a un 64.9% de pacientes de la cohorte ECNL ($p=0.33$). De estos datos podemos deducir que la necesidad de iniciar tratamiento con IMM por corticodependencia o corticorrefractariedad fue similar en ambos grupos y que el presentar cierto grado de linfopenia basal previo al inicio no fue una contraindicación a la hora de indicar estos fármacos a los pacientes de ambos grupos. La probabilidad acumulada de iniciar el tratamiento con IMM tampoco presentó diferencias significativas durante el tiempo de seguimiento respecto a ambas cohortes.

La tasa de pacientes en los que se inició tratamiento con fármacos biológicos fue similar entre ambas cohortes. En la ECTL, la necesidad de iniciar tratamiento con estos fármacos fue del 17.2% frente al 26.3% de los pacientes sin datos de linfopenia primaria. La probabilidad acumulada tampoco presentó

diferencias con un HR no significativo. En el algoritmo habitual aceptado en las diferentes guías clínicas publicadas en la literatura mundial, el tratamiento con fármacos biológicos es el escalón siguiente a los fármacos IMM y una de sus indicaciones habituales es la persistencia de corticodependencia pese al tratamiento con tiopurínicos (100,101). El hecho de que en seis años la tasa de tratamiento con biológicos sea similar en ambos grupos sugiere el hecho de que en la práctica habitual los pacientes presentaron respuestas similares al tratamiento con IMM pese a la diferencia en el número absoluto y relativo de linfocitos y a la tendencia que se apreció en la necesidad de modificar las dosis por mielotoxicidad en la cohorte ECTL.

Un hallazgo relevante en nuestro estudio es la existencia de diferencias significativas en la necesidad de cirugías resectivas entre ambas cohortes. Los pacientes con tendencia a la linfopenia primaria fueron sometidos a este tipo de cirugías en un 24.1% mientras que en la cohorte no linfopénica la tasa fue de 10.5%. Esta diferente necesidad de tratamiento quirúrgico apoya la existencia de un fenotipo que se asocia a una peor evolución. En otra enfermedad granulomatosa como es la sarcoidosis, se ha descrito de forma similar que los pacientes con tendencia a la linfopenia primaria presentan un curso evolutivo peor y con manifestaciones extraarticulares más frecuentes (80).

Con respecto a las características anatomopatológicas, se apreció en estudios previos que existía una mayor frecuencia de granulomas en las piezas quirúrgicas de pacientes con tendencia a la linfopenia respecto al resto de los pacientes con EC (76). En nuestro estudio sin embargo, no se objetivaron

diferencias significativas en la tasa de hallazgos de granulomas en estas cirugías resectivas (42.9% en ECTL vs 33.3% en ECNL). Entre nuestro estudio y el previo al que se hace referencia han pasado más de 30 años en los que las indicaciones quirúrgicas han disminuido mucho por el desarrollo de nuevos fármacos en el tratamiento de la EC. Por lo tanto creemos que la baja tasa de pacientes que fueron sometidos a cirugías resectivas en nuestro estudio limitó el análisis estadístico de esta variable y que por lo tanto precisaríamos de estudios con tamaños muestrales mayores para su correcta evaluación.

Como hemos comentado previamente, los datos de nuestro estudio objetivaron que los pacientes ECTL presentaron con mayor frecuencia cirugías por formas penetrantes y ello a pesar de que esta cohorte fue tratada con igual frecuencia que la cohorte ECNL con fármacos IMM y biológicos. Una causa de fallo de las terapias biológicas es el desarrollo de anticuerpos contra dichos fármacos. La generación de estos anticuerpos proteicos se ha puesto en relación inversa con el tratamiento sincrónico con IMM (102,103). Una teoría fisiopatológica que planteamos en relación a la mayor tasa de cirugía resectiva en la cohorte ECTL es que los pacientes ECTL al haber presentado mayor tasa de mielotoxicidad recibieron en líneas generales dosis menores del fármaco IMM en el momento del inicio del fármaco biológico. Esto pudo favorecer una mayor producción de anticuerpos frente a fármacos biológicos que pudieran disminuir su efectividad a la larga, aumentando la tasa de cirugías resectivas.

Como era esperable, los pacientes ECTL tuvieron un recuento medio de linfocitos totales inferior a la cohorte ECNL (1.152 vs. 2.304 $p < 0.001$). Pese a

esta diferente cantidad de linfocitos en ambos grupos se aplicaron las mismas medidas de seguimiento clínico-analítico que se siguen en nuestra práctica clínica habitual de acuerdo a nuestro protocolo de seguimiento de pacientes con IMM, según se ha explicado en la sección 3.3.1. Con este seguimiento se apreciaron diferencias significativas en lo relativo a la aparición de mielotoxicidad. En los pacientes ECTL se apreció toxicidad medular en el 61.9% de los individuos mientras sólo el 38.1% de la cohorte ECNL presentó dichos criterios ($p < 0.001$) a lo largo de los 6 años de seguimiento. El OR de este evento fue de 35.75 a favor de los pacientes con tendencia a la linfopenia primaria.

El manejo habitual de la mielotoxicidad en relación con IMM es una disminución en la dosis del fármaco con el objetivo de lograr unos valores hematimétricos dentro de límites de seguridad (104,105). Si esto no se consigue o si la mielodepresión inicial fuera muy intensa, se indica la retirada definitiva del fármaco tiopurínico. Este estudio reflejó que los pacientes con tendencia a la linfopenia primaria precisaban de retirada del fármaco más frecuentemente que los pacientes sin aquella tendencia (25% vs. 5.4%). Los pacientes de la cohorte ECNL presentaron mielotoxicidad en tasas muy similares a las descritas en estudios de nuestro medio de pacientes con EC no diferenciada por cantidad de linfocitos (106). De igual manera, se apreció que la disminución en la dosis del IMM se dio de manera más frecuente en la cohorte ECTL frente a la ECNL (56.3% vs. 5.4%). Por lo tanto, se confirmó que los pacientes de la cohorte ECTL tuvieron más posibilidades tras el inicio del fármaco IMM de presentar

mielotoxicidad y que su dosis de AZA o 6MP fuese reducida o menos frecuentemente suspendida como respuesta al evento adverso.

Sin embargo y pese a todos los casos de mielotoxicidad que se han descrito en la sección de resultados en la cohorte ECTL, es llamativo el hecho de que no se apreciaran en los 6 años de seguimiento ningún caso de enfermedad oportunista asociada a la linfopenia ni ningún otro tipo de patología infecciosa grave, frente a los dos casos que se registraron en la cohorte ECNL. Como se ha comentado, el seguimiento en ambas cohortes fue el mismo, y el control analítico y clínico de los pacientes con linfopenia secundaria a los IMM fue también idéntico en ambas cohortes. El hecho de que la depresión medular secundaria a fármacos tiopurínicos no motivase complicaciones infecciosas relevantes en este estudio se puede explicar por el hecho de que la linfopenia apreciada no llegase a ser relevante clínicamente. Esto estaría en relación con el riguroso, pero habitual control analítico, clínico y de reajuste de dosis al que todos los pacientes fueron sometidos. Este hecho apoya la estrategia de control de pacientes con tratamientos activos con IMM ya que se ha demostrado útil y efectiva en la prevención de complicaciones derivadas de la mielotoxicidad, incluso en pacientes en los que previamente al inicio de fármacos tiopurínicos, presentaban cifras absolutas de linfocitos con tendencia a rangos linfopénicos.

No obstante, aunque el control de estos pacientes sea efectivo para evitar complicaciones de la linfopenia, es un hecho que el pertenecer a la cohorte de ECTL limitó de forma significativa el uso prolongado de IMM. Esto, como se ha

comentado previamente, probablemente estuvo en relación con la mayor tasa de cirugías resectivas al tener limitado el acceso a unos fármacos tan efectivos y que son capaces de modificar la historia natural de la enfermedad como son los tiopurínicos.

Como conclusión de este estudio, creemos probado que se describe la existencia de un fenotipo linfopénico en la EC. Este fenotipo engloba en torno al 20% de los pacientes con esta enfermedad y el diagnóstico de inicio se da en pacientes de mayor edad que aquellos pacientes con EC sin tendencia a la linfopenia. Los pacientes ECTL son sometidos a cirugías resectivas en proporción mayor al resto aunque presentan tasas acumuladas de inicio de tratamiento con IMM y con biológicos similares a los pacientes ECNL. Los pacientes con tendencia a la linfopenia tienen una probabilidad mayor de presentar mielotoxicidad como evento adverso de los fármacos tiopurínicos. Esto obliga en un alto porcentaje de estos pacientes a la disminución de dosis o incluso a la suspensión definitiva del fármaco. No obstante, se ha demostrado que una estrategia de control clínico-analítica igual a la realizada en el resto de pacientes es segura y efectiva dado que evita la aparición de infecciones relevantes, por lo que creemos que identificar a un paciente con tendencia a la linfopenia primaria no debería ser contraindicación para el inicio de fármacos IMM.

Este estudio tiene relevancia en la aplicación clínica, ya que poder conocer la existencia de este fenotipo permite advertir que un subgrupo importante de

pacientes con EC pueden presentar peor evolución debido a una mayor toxicidad a IMM y una tasa aumentada de cirugía resectiva.

Son evidentemente necesarios estudios complementarios que aporten información de la que no disponemos con este estudio. Sería de gran interés plantear si la modificación a la baja de las dosis iniciales y objetivo de IMM podría limitar el desarrollo de mielotoxicidad en estos pacientes. Otra posibilidad a desarrollar en el futuro sería si una estrategia *top-down* (tratamiento inicial con IMM y fármacos biológicos tras apreciar corticodependencia) empleada en esta subpoblación sería una opción efectiva para disminuir la tasa de cirugías resectivas.

4.- EVALUACIÓN MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO MULTIPARAMÉTRICA DE SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS EN PACIENTES CON ENFERMEDAD DE CROHN CON TENDENCIA A LA LINFOPENIA PRIMARIA, PACIENTES CON ENFERMEDAD DE CROHN SIN LINFOPENIA Y CONTROLES SANOS

4.1.- FUNDAMENTO E HIPÓTESIS

Como se ha descrito previamente, en la práctica clínica se detectó la existencia de un subgrupo de pacientes con EC que, ya en el momento del diagnóstico, y sin que existiera interacción con fármacos, presentaba una tendencia a la linfopenia, con reducción paralela de la proporción relativa en el recuento leucocitario.

Existen cuatro grandes subtipos de diferenciación del linfocito T CD4+: Los linfocitos Th1, que se encargan de la respuesta efectora inmunitaria a patógenos intracelulares mediante la activación de macrófagos y células *natural killer* (NK); los linfocitos Th2, que efectúan una respuesta efectora frente a patógenos extracelulares como los helmintos o los artrópodos; los linfocitos Th17, que están implicados en respuestas inmunitarias de carácter proinflamatorio tras su activación y que son activos especialmente frente a agentes extracelulares; y los linfocitos T reguladores (Treg), cuya diferenciación suprime las respuestas inmunitarias efectoras previas (107,108).

Los Treg son una subpoblación de linfocitos cuyo papel en la inmunidad es el de frenar la inflamación con el objeto de evitar estados inflamatorios crónicos cuando la causa de la misma ha sido superada (109). A pesar de que su mera existencia fue puesta en duda durante muchos años, estudios desde la década de los 90 han demostrado su papel crucial en el reconocimiento y tolerancia a autoantígenos, el evitar el desencadenamiento de enfermedades autoinmunes, y permitir el control del desarrollo de una respuesta inmunitaria exagerada frente a agentes patógenos o distintos alérgenos; así como a disminuir el estímulo proinflamatorio de la flora comensal del tracto digestivo (110). Existen tres tipos fundamentales de linfocitos reguladores según el linaje T o B y según la subpoblación T: los reguladores “clásicos”, de tipo CD4⁺ (Treg), los reguladores CD8⁺ (TregCD8⁺, también denominados supresores) y los linfocitos B reguladores (Breg).

Los linfocitos Treg naturales (existe una fracción de Treg inducidos ajena a este estudio) de origen tímico, son típicamente CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺, aunque también se acepta su caracterización mediante CD4⁺CD25^{high}. La fisiología molecular de los Treg sigue aún hoy en discusión, aunque parece que se basa en una doble capacidad de modulación de la inmunidad innata y adquirida y que se traduce en la inhibición de la proliferación celular de linfocitos CD4⁺ efectores (111):

- 1.- Supresión directa mediante contacto intracelular, a través de la producción y liberación de granzimas/perforinas con actividad citolítica frente al linfocito T efector.

2.- Supresión indirecta mediante la producción de citoquinas inhibitoras por parte de estas células reguladoras.

Esta regulación se realiza a expensas de la producción por parte de los Treg de citoquinas, como el factor de crecimiento tumoral *beta* (TGF- β) y la interleuquina 10 (IL-10), con actividad frente a linfocitos T efectores y células presentadoras de antígeno. Los Treg corresponden aproximadamente al 5% de la población total de células T CD4⁺ (112) y su marcador más típico es el factor de transcripción *FoxP3*, expresado tanto en fase activa como en reposo, gen que se ubica en el cromosoma X y que codifica para una proteína llamada escurfina. La deficiencia congénita de este gen desencadena varios síndromes autoinmunitarios, incluyendo una inmunodeficiencia con infecciones recurrentes o graves, una desregulación inmunitaria, con poliendocrinopatía y enteropatía severa ligada al X (IPEX) (113).

La actividad citotóxica de los linfocitos T se basa de una manera importante en la vía granzima-perforina (114). En los gránulos citotóxicos que secretan de forma extracelular se encuentran unas proteasas llamadas granzimas que penetran en la célula diana tras la producción de poros permeables en la membrana celular por las perforinas. Estas perforinas son glicoproteínas calcio dependientes que además de permitir la entrada a las granzimas, producen pérdida del contenido citoplasmático. Esta vía de actividad no sólo se encuentra en los LT CD8⁺ convencionales, sino que tiene un papel relevante en la actividad de todas las poblaciones de linfocitos reguladores (los linfocitos TregCD8⁺, los Treg y los Breg), pudiendo permitir la monitorización de su

actividad celular antiproliferativa de forma cuantitativa (115). Nuevas técnicas basadas en citometría de flujo y en inmunofluorescencia son actualmente capaces de identificar y cuantificar la proporción de células que expresan perforina intracelular o la activación intracelular individual de cada célula (*single cell level*). Mediante estos procedimientos, es posible medir de manera directa la activación celular que presentan las diferentes poblaciones de células reguladoras en las muestras seleccionadas (116).

Los linfocitos B son células productoras de anticuerpos y responsables de la inmunidad humoral, corresponden al 10-15% de los linfocitos totales y su maduración se efectúa en la médula ósea y en los ganglios linfáticos. Recientes estudios han determinado un subtipo regulador de linfocitos B (Breg) que expresa CD19+FoxP3+ o CD19+CD25+^{high} con actividad reguladora mediante la producción de IL-10 y la reducción de interferón *gamma* (IFN- γ), factor de necrosis tumoral *alfa* (TNF- α) e interleuquina 17 (IL-17). Su actividad reguladora también se basa en la capacidad, tras su activación, de estimular la diferenciación de Treg que contribuyen a la modulación de la respuesta inmunitaria (117).

Por otra parte, los linfocitos T CD8+, clásicamente denominados citotóxicos o supresores, presentan también una subpoblación reguladora (TregCD8+) con capacidad de realizar un *down regulation* (regulación a la baja) sobre la respuesta inflamatoria mediante citoquinas como IL-10 y TGF- β y contacto célula-célula, como ya hemos descrito mediante la vía granzima-perforina (118,119).

Existe escasa literatura que cuantifique los Treg en la EC, pero globalmente podemos observar por aquellos datos que esta patología presenta desde el punto de vista inmunológico la particularidad de tener un recuento absoluto y relativo menor de Treg periféricos en presencia de brote clínico respecto a la ausencia de actividad inflamatoria a costa de una situación inversa en la lámina propia de los tejidos afectados (87). Los pocos estudios de Treg en pacientes con EC han determinado que existe una disminución global del recuento cuantitativo y cualitativo de Treg en los pacientes con EC (120). Existen datos muy limitados de los TregCD8+ en la EC (121) con datos de expresión alterada en pacientes con EII y en respuesta a *F. prausnitzii*, bacteria comensal del intestino humano. No existen datos hasta la fecha de estudios que hayan comparado al espectro global de linfocitos reguladores en la EC en un subgrupo linfopénico como el que se describe a continuación.

Se ha descrito un dimorfismo sexual en relación a la incidencia y a la prevalencia de la patología autoinmunitaria, aunque es bastante menos marcada en la EC que en otras enfermedades como la esclerosis múltiple, la esclerodermia u otras. En varios estudios se demostró una variación de la actividad reguladora en función del ciclo menstrual, ya que el estradiol mejora esta capacidad en las Treg al aumentar la expresión de perforinas, al menos en ensayos *in Vitro* (122).

En este estudio se analizó mediante un estudio de tipo transversal a una muestra de pacientes con ECTL, otra con ECNL y un tercer grupo de pacientes sanos que sirvieron de controles. Para ello se realizó una citometría de flujo

multiparamétrica bajo criterio de remisión de actividad en pacientes que no consumían fármacos potencialmente mielotóxicos y libres de patologías que pudieran afectar al recuento leucocitario o hematológico en general. Mediante este procedimiento técnico se intentó demostrar la hipótesis de que existen diferencias en los valores absolutos o relativos de Treg, Breg o TregCD8+ y/o una variación en su actividad medida como expresión de perforina en los pacientes con ECTL respecto a la ECNL, para así apoyar la existencia desde el punto de vista básico de un fenotipo linfopénico.

4.2.- OBJETIVOS

El objetivo de este estudio es analizar diferencias en la cantidad y actividad de subtipos de linfocitos reguladores en un grupo de pacientes con ECTL respecto a otro de ECNL y a un grupo control utilizando técnicas de citometría de flujo con pacientes sin criterios de actividad para caracterizar, cuantificar y analizar los tres tipos de linfocitos reguladores (CD4+, CD8+ y CD19+) en sangre periférica.

4.3.- MATERIAL Y MÉTODOS

4.3.1.- DISEÑO, POBLACIÓN Y ÁMBITO

Se trata de un estudio transversal en el que para realizarlo se han diseñado tres grupos de pacientes: grupo ECTL, grupo ECNL y grupo de controles sanos. El grupo ECTL se formó con 12 pacientes consecutivos en seguimiento por la Unidad de Enfermedades Inflamatorias Intestinales del Servicio de

Aparato Digestivo del Hospital Clínico San Carlos que cumplían criterios de inclusión en grupo de ECTL en ausencia de criterios de exclusión.

Por su parte, se incluyeron como grupo ECNL el mismo número, doce, de pacientes que en la población ECTL, pareados por sexo y que cumplían criterios de inclusión y exclusión del estudio sin presentar criterios de asignación al grupo ECTL. Estos pacientes se seleccionaron en la consulta habitual de la Unidad tras aceptar su participación.

Finalmente para el grupo de controles, se seleccionaron voluntarios sanos pareados por sexo y por momento del ciclo menstrual en el caso de las voluntarias. Por lo tanto el grupo se formó con 6 hombres y 12 mujeres de las que seis se encontraban en el inicio del ciclo menstrual y otras seis en la mitad del mismo.

4.3.2.- RECOGIDA DE DATOS Y CODIFICACIÓN

Tras ser contactados los pacientes de forma presencial o telefónica mediante una breve entrevista para confirmar datos personales y características basales y la aceptación voluntaria de los mismos tanto verbal como escrita se procedió a la firma del consentimiento informado realizado *ex profeso* (Anexo 1). Se procedió posteriormente a extraer muestras de sangre periférica por el personal de enfermería de la Unidad de EII del Hospital Clínico San Carlos de los pacientes de ambos grupos y de los controles sanos (10 cc), en tubos de ensayo *Vacutainer* con EDTA-heparinizado.

Se procesaron y analizaron a continuación en las siguientes 4 horas a la extracción. Para ello, se prepararon 5 tubos (control isotópico, Treg CD4+, Treg CD8+ y Breg), con 180µl para las Treg y Breg y 90ul para el tubo control. Los tubos estuvieron en todo momento debidamente etiquetados de acuerdo a los anticuerpos monoclonales (mAbs) que se utilizaron para la tinción de superficie. (CD4-PerCP, CD8-PerCP, CD25-APC, CD19). Después de esta primera tinción, se dejó incubar durante 20 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente. A continuación, se lisaron los glóbulos rojos, mediante la aplicación de 2ml de solución lisante (FACSTM-Lysing Solution, Becton Dickinson, San Jose, CA, USA), y se incubó durante 15 minutos en oscuridad, para luego ser extraído y lavado con 2 ml de PBS (phosphate-buffered saline).

La expresión de FoxP3 y perforina se analizó mediante tinción intracelular. Para ello, se suspendieron las células en 1ml de solución permeabilizante (eBioscienceFixation/permeabilization), con incubación durante 20 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad y lavado a continuación. Posteriormente, las células se tiñeron con anticuerpo mAbs, FoxP3 (FITC) y Perforina (PE), para tras ello ser incubadas durante 20 minutos en oscuridad, y nuevamente lavadas. La adquisición y el análisis de las células, se efectuó por citometría de flujo multiparamétrica (FacScalibur, Becton Dickinson), utilizando un CELLQUEST Software (Becton Dickinson).

	FITC	PE	APC/PerCP Cy5	Alexa- Fluor®488
Treg	CD4	Perforina	CD25	FoxP3
Breg	FoxP3	Perforina	CD19	
TregCD8+	CD8	Perforina	CD25	FoxP3

Tabla 25: Anticuerpos monoclonales

4.3.3.- CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN

Para la inclusión de pacientes en este estudio se han establecido unos criterios de inclusión y exclusión muy estrictos, a fin de no introducir pacientes límite dado lo ajustado del tamaño muestral.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN EN GRUPO ECTL

Paciente con diagnóstico de EC realizado o corroborado por un facultativo perteneciente a la Unidad de Enfermedad Inflamatoria Intestinal del Servicio de Aparato Digestivo del Hospital Clínico San Carlos y valorado por vez primera entre el 1 de enero de 2009 y el 1 de enero de 2013, con seguimiento en nuestra Unidad al menos durante un año. Además debía cumplir los siguientes criterios:

- Encontrarse en remisión clínica a criterio de los facultativos de la Unidad de Enfermedad Inflamatoria Intestinal del Servicio de Aparato Digestivo del Hospital Clínico San Carlos.
- Adherencia terapéutica a los tratamientos y las órdenes médicas dadas a lo largo de este seguimiento de al menos un año.

- Disponer de al menos 3 análisis de sangre periférica en situación de remisión clínica de la EC según Historia Clínica, en ausencia de fármacos IMM, terapia biológica o fármacos que presenten un potencial efecto mielotóxico en su ficha técnica y con al menos 6 meses de diferencia entre el primer y el último análisis.
- No presentar trombopenia o neutropenia asociada en ninguna evaluación analítica en la que se presente linfopenia.
- Presentar en al menos dos análisis cifras absolutas de linfocitos iguales o menores a 1000 células/mm³.
- No superar la cifra de 1500 linfocitos/ mm³ en ningún control analítico.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN EN GRUPO ECNL

Paciente con diagnóstico de EC realizado o corroborado por un facultativo perteneciente a la Unidad de Enfermedad Inflamatoria Intestinal del Servicio de Aparato Digestivo del Hospital Clínico San Carlos y valorado por vez primera entre el 1 de enero de 2009 y el 1 de enero de 2013, con seguimiento en nuestra Unidad al menos durante un año. Además debe cumplir los siguientes criterios:

- Encontrarse en remisión clínica a criterio de los facultativos de la Unidad de Enfermedad Inflamatoria Intestinal del Servicio de Aparato Digestivo del Hospital Clínico San Carlos.
- Adherencia terapéutica a los tratamientos y las órdenes médicas dadas a lo largo de este seguimiento.
- Disponer de al menos 3 análisis de sangre periférica en situación de remisión clínica de la EC según Historia Clínica, en ausencia de fármacos IMM, terapia biológica o fármacos que presenten un potencial efecto mielotóxico en su ficha técnica y con al menos 6 meses de diferencias entre el primer y el último análisis.
- No presentar en ningún momento cifras absolutas de linfocitos séricos menores a 1500 células/mm³.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN DE CUALQUIER GRUPO

- Haber sido sometido a cirugía abdominal resectiva que haya afectado a cualquier segmento de colon, intestino delgado o estómago.
- Encontrarse en el momento del diagnóstico o al ser valorado por la Unidad en el caso de pacientes remitidos por otros centros, en

tratamiento activo con fármacos IMM, biológicos u otros fármacos potencialmente mielotóxicos.

- Presentar positividad para anticuerpos frente al virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o estar diagnosticado de alguna enfermedad inmunológica.
- Haber presentado en los últimos 5 años enfermedad oncológica.
- No cumplir todos los criterios de inclusión.

Como criterios para garantizar la homogeneidad de las poblaciones se ha establecido que el tamaño muestral de pacientes con ECNL sea el mismo que en el grupo ECTL y que estuvieran pareados por sexos.

Como grupo control se tomaron voluntarios sanos a criterio del investigador. El grupo se decidió conformarlo con el mismo número de varones seleccionados en el grupo ECTL, el mismo número de mujeres al inicio del ciclo menstrual de aquel grupo y nuevamente el mismo número de mujeres pero a la mitad de dicho ciclo para igualar la muestra.

4.3.4.- VARIABLES DE ESTUDIO

A continuación se describen todas las variables incluidas en este estudio para ser luego analizadas posteriormente.

- Sexo: 1: hombre. 2: mujer.
- Linfocitos T CD4+CD25+FoxP3+: porcentaje de linfocitos Treg respecto al global de linfocitos T CD4+ seleccionados mediante positividad en la citometría de flujo a CD4, CD25 y FoxP3.
- Linfocitos T CD4+CD25^{high}: porcentaje de linfocitos Treg respecto al global de linfocitos T CD4+ seleccionados mediante positividad en la citometría de flujo a CD4 y CD25^{high} (de alta intensidad de expresión).
- Linfocitos B CD19+CD25^{high}FoxP3+: porcentaje de linfocitos B reguladores respecto al global de linfocitos B (CD19+) seleccionados mediante positividad en la citometría de flujo a CD19, FoxP3 y CD25^{high}.
- Linfocitos B CD19+CD25+: porcentaje de linfocitos B reguladores respecto al global de linfocitos B (CD19+) seleccionados mediante positividad en la citometría de flujo a CD19 y CD25^{high}.
- Linfocitos T CD8+CD25+FoxP3+: porcentaje de linfocitos T reguladores CD8 respecto al global de linfocitos T citotóxicos seleccionados mediante positividad en la citometría de flujo multiparamétrica a CD8, FoxP3 y CD25^{high}.
- Linfocitos T CD8+CD25+: porcentaje de linfocitos T reguladores CD8 respecto al global de linfocitos T citotóxicos (CD8+) seleccionados

mediante positividad en la citometría de flujo multiparamétrica a CD8 y CD25^{high}.

- Linfocitos T CD8+FoxP3+: porcentaje de linfocitos T reguladores CD8 respecto al global de linfocitos T citotóxicos (CD8+) seleccionados mediante positividad en la citometría de flujo multiparamétrica a CD8 y FoxP3.
- Porcentaje de perforina: porcentaje de células que expresan perforina intracelular en cada subtipo celular. Este valor es una medida fiable para expresar la actividad celular del subtipo de linfocito regulador de forma poblacional.
- *Mean fluorescent intensity* (MFI) de perforina: cuantificación de perforina expresada en cada célula del subtipo celular especificado medida mediante técnicas de inmunofluorescencia en citometría de flujo. Refleja el nivel de activación de cada célula de forma global (*single cell level*).

4.3.5.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para describir las variables continuas se utilizó la media como estadístico de centralización y la desviación estándar como estadístico de dispersión o la mediana y el rango intercuartílico (RIC: P25-P75) y se compararon utilizando el test no paramétrico U de Mann Whitney.

Los datos se presentaron de manera visual mediante gráficos de “caja y bigotes” (*box plots*).

Los cálculos se llevaron a cabo con el paquete estadístico para Microsoft Windows SPSS versión 22 (Chicago, IL, USA).

4.4.- RESULTADOS

4.4.1.- COMPARACIÓN ENTRE CANTIDAD Y ACTIVIDAD DE TREG

Como se ha comentado, se realizó una citometría de flujo *ex vivo* a los pacientes de los tres grupos para la determinación de Treg en función de su diferenciación por positividad a CD4+CD25+FoxP3+ o CD4+CD25+*high*. Asimismo, y de manera simultánea se realizó una valoración de la actividad de estos Treg en función del porcentaje celular de expresión de perforina.

Células Treg	NEC	ECNL	ECTL
CD4+CD25+FoxP3+	1.73±2.06 0.57 (0.28-3.34)	0.48±0.63 0.25^a (0.1-0.42)	0.83±0.79 0.52 (0.24-1.26)
% Perforina	7.61±8.08 5.87 (2.13-11.46)	6.88±6.17 4.19 (2.45-12.54)	4.85±5.31 2.77 (0.22-9.72)
<i>MFI</i> Perforina	24.19±14.65 18.85 (13.67-36.81)	115.96±78.19 104.61^a (67.58-122.28)	638.81±1011.86 93.01 (6.79-934.77)
CD4+CD25+ <i>high</i>	1.15±0.72 0.9 (0.62-1.44)	0.84±0.48 0.71 (0.43-1.4)	2.26±2.08 1.28^b (0.92-3.27)
% Perforina	2.68±3.46 1.28 (0-1.44)	1.84±2.11 1.51 (0.79-1.63)	0.43±0.56 0.26^b (0-0.85)
<i>MFI</i> Perforina	20.11±33.62 10.97 (0-14.16)	132.64±142.59 103.34^a (54.51-151.28)	96.93±125.46 24.58^a (13.42-222.68)

^a Diferencias con NEC

^b Diferencias con ECNL

Tabla 26: Porcentaje de subtipos de linfocitos Treg sobre el total de linfocitos CD4+ y expresión individualizada de perforina de estas subpoblaciones.

NEC Vs ECNL

NEC vs ECNL	CD4+FOXP3+CD25+	%Treg-Perf	MFI Perf Treg	CD4+CD25+ hi	%Treg-Perf	MFI Perf Treg
U de Mann-Whitney	49	108	1	87	97,5	17
Sig. exacta (bilateral)	0,011*	1	<0.001*	0,385	0,668	<0.001*

*p<0.05

Tabla 27: Diferencias en los Treg entre NEC y ECNL.

Los pacientes del grupo ECNL presentaron un porcentaje significativamente menor de Treg que los del grupo control NEC ($p=0.011$) al identificar estas células por positividad a CD4+CD25+FoxP3+. Además se apreció un aumento significativo en la expresión intracelular de perforina en el grupo ECNL respecto al NEC en los Treg identificados por CD4+CD25+FoxP3+ y por CD4+CD25+^{high} ($p<0.001$ en ambos casos).

NEC Vs ECTL

NEC vs ECTL	CD4+FOXP3+ CD25+	%Treg-Perf	MFI Perf Treg	CD4+CD25+ hi	%Treg-Perf	MFI Perf Treg
U de Mann-Whitney	90	79	66	65,5	67	18
Sig. exacta (bilateral)	0,458	0,231	0,078	0,073	0,078	0,004*

*p<0.05

Tabla 28: Diferencias en los Treg entre NEC y ECTL.

No hubo diferencias significativas en el número de Treg entre los grupos NEC y ECTL, independientemente del método de identificación de dichos linfocitos. Respecto a la actividad, se apreció que la expresión intracelular de perforinas fue mayor en los pacientes del grupo ECTL ($p=0.004$) midiéndola por la MFI en la subpoblación de Treg CD4+CD25+^{high} y con una tendencia muy cercana a la

significación en el caso de la subpoblación de Treg CD4+CD25+FoxP3+ (p=0.078).

ECNL Vs ECTL

ECNL vs ECTL	CD4+FOXP3+CD25+	%Treg-Perf	MFI Perf Treg	CD4+CD25+ hi	%Treg-Perf	MFI Perf Treg
U de Mann-Whitney	40	53,5	62	38	19,5	28
Sig. exacta (bilateral)	0,065	0,23	0,832	0,05*	0,001*	0,261

*p<0.05

Tabla 29: Diferencias en los Treg entre ECNL y ECTL.

Los pacientes del grupo ECTL presentaron un porcentaje significativamente mayor de Treg respecto al grupo ECNL al identificar estas células mediante CD4+CD25+^{high} (p=0.05) y una tendencia cercana a la significación si se valoraban los linfocitos Treg mediante expresión de CD4+CD25+FoxP3+ (p=0.065). Respecto a la actividad de los Treg determinada por la perforina intracelular, se apreció un aumento en el porcentaje de células que las expresaron en el grupo ECNL respecto al ECTL al identificar los Treg por CD4+CD25+^{high} (p<0.001).

Diferencias globales y conclusión

Valorando los resultados de forma comparativa, se apreció que existió una tendencia a que en el grupo de pacientes de ECTL la proporción de Treg fuese mayor que en el grupo de ECNL pero con una actividad medida por la expresión porcentual de perforina menor que en grupo no linfopénico. Al comparar estos grupos con los controles sanos, se apreció que en el grupo

NEC el porcentaje de Treg era mayor que globalmente en los dos grupos de pacientes con EC, además de presentar una expresión de perforina muy variable respecto a los otros dos grupos.

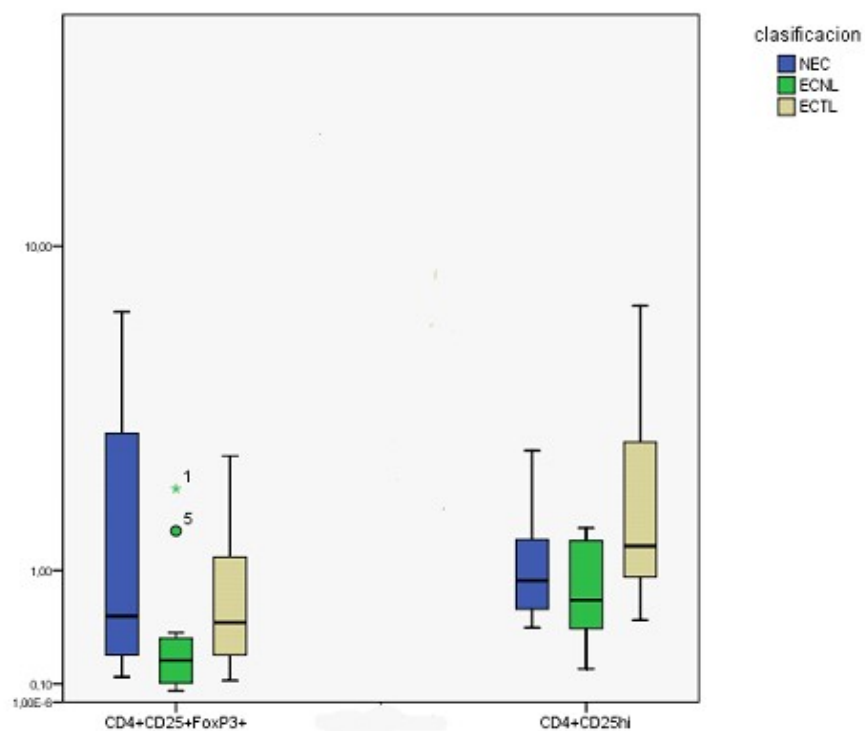


Figura 8: Citometría de flujo multiparamétrica de subpoblaciones de Treg.

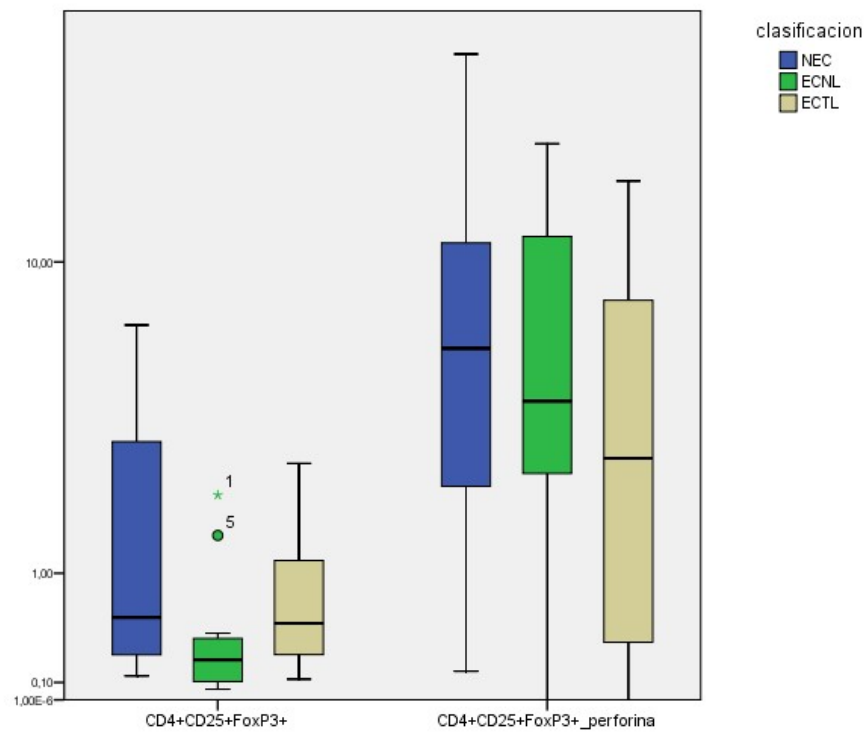


Figura 9: Citometría de flujo multiparamétrica de CD4+CD25+FoxP3+ y su expresión de perforina.

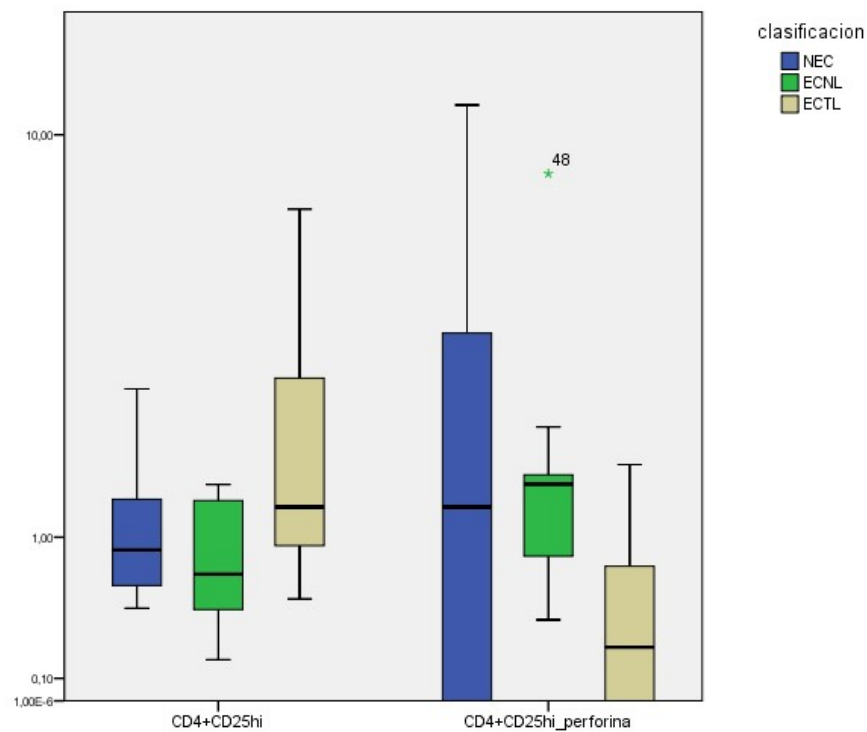


Figura 10: Citometría de flujo multiparamétrica de CD4+CD25h+ y su expresión de perforina.

4.4.2.- COMPARACIÓN ENTRE CANTIDAD Y ACTIVIDAD DE BREG

De manera similar a la evaluación de los Treg, se realizó una medición cuantitativa en las tres subpoblaciones de linfocitos Breg en función de su diferenciación por positividad a CD19+CD25+FoxP3+, CD19+CD25+ o CD19+FoxP3. De manera simultánea se realizó una valoración descriptiva de la actividad de estos Breg en función del porcentaje celular de expresión de perforina y por el parámetro numérico cuantitativo de intensidad media fluoroscópica (MFI).

Células Breg	NEC	ECNL	ECTL
CD19+CD25+FoxP3+	0.55±0.61 0.29 (0.21-0.79)	0.44±0.34 0.34 (0.09-0.72)	0.8±0.72 0.64 (0.28-1.08)
%Perf Breg	20.57±26.26 8.76 (0-36.61)	25.61±19.38 21.15 (8.98-45.39)	20.41±16.29 15.04 (9.47-31.66)
MFI Perf Breg	25.89±28.45 15.3 (0-44.69)	544.67±963.31 262.93 ^a (141.13-515.3)	222.91±290.11 67.93 ^a (25.12-434.7)
CD19+CD25+	24.09±11.45 23.63 (14.78-33.5)	6.85±6.62 3.92 ^a (2.92-7.77)	11.64±7.26 9.09 ^{a,b} (7.02-19.24)
%Perf	6.31±18.75 0.91 (0.59-2.48)	4.41±2.63 4.23 ^a (1.92-6.75)	3.37±4.19 2.09 (0.87-4.51)
MFI Perf	29.95±21.98 22.98 (12.04-47.36)	261.18±350.68 142.88 ^a (118.2-235.68)	97.55±92.04 52.63 ^{a,b} (29.62-155.9)
CD19+FoxP3+	2.77±3.45 1.67 (0.87-2.09)	3.56±4.16 1.75 (0.94-5.64)	3.78±3.14 2.85 (1.12-6.37)
%Perf	12.26±23.61 4.52 (0.42-12.85)	30.03±17.48 27.23 ^a (16.31-41.34)	18.47±14.22 17.15 ^a (6.88-31.24)
MFI Perf	36.86±38.91 24.49 (8.81-64.14)	390.02±333.34 240.1 ^a (128.71-672.84)	212.67±203.79 145.96 ^a (30.19-371.8)

^a Diferencias con NEC

^b Diferencias con ECNL

Tabla 30: Porcentaje de subtipos de linfocitos Treg sobre el total de linfocitos B y expresión individualizada de perforina de estas subpoblaciones.

NEC Vs ECNL

NEC vs ECNL	CD19+ CD25+ FoxP3+	%Perf Breg	MFI Perf Breg	CD19+ CD25+	%Perf CD25	MFI Perf CD25	CD19+ Fox+	%Perf FoxP3	MFI Perf FoxP3
U de Mann-Whitney	102	80,5	2	15	42	6	97,5	30	5
Sig. exacta (bilateral)	0,811	0,251	<0.001*	<0.001*	0,004*	<0.001*	0,669	0,001*	<0.001*

*p<0.05

Tabla 31: Diferencias en Breg entre NEC y ECNL.

Los pacientes del grupo control presentaron un porcentaje significativamente mayor de Breg respecto al grupo ECNL cuando se identificaron mediante CD19+CD25+ ($p<0.001$). No se apreciaron esas diferencias al identificar los Breg mediante CD19+CD25+FoxP3+ ni CD19+FoxP3+, lo que puede deberse a los bajos porcentajes de esta subpoblación con respecto a los linfocitos B totales.

El grupo de pacientes ECNL presentó una expresión intracelular significativamente mayor de perforina de forma global. Este aumento de expresión fue superior medida por MFI al identificar las Breg como CD19+CD25+FoxP3+ ($p=0.001$), como CD19+CD25+ ($p<0.001$) y como CD19+FoxP3+ ($p<0.001$). Estas diferencias también son evidentes al comparar la expresión intracelular de perforina respecto al porcentaje de células que las expresan, ya que el grupo NEC tuvo mayor activación al identificar las Breg como CD19+CD25+ ($p<0.004$) y como CD19+FoxP3+ ($p<0.001$).

NEC Vs ECTL

NEC vs ECTL	CD19+	CD19+ CD25+ FoxP3+	%Perf Breg	MFI Perf Breg	CD19+ CD25+	%Perf CD25	MFI Perf CD25	CD19+ FoxP3+	%Perf FoxP3+	MFI Perf FoxP3+
U de Mann-Whitney	99	82,5	88	39	36	79	44	72	62,5	39
Sig. exacta (bilateral)	0,72	0,289	0,406	0,005*	0,002*	0,227	0,012*	0,134	0,054	0,005*

*p<0.05

Tabla 32: Diferencias en Breg entre NEC y ECTL.

Los pacientes controles presentaron un porcentaje significativamente mayor de Breg respecto al grupo ECTL al identificar estas células como CD19+CD25+ (p=0.002), si bien este hecho no se confirmó en ninguna determinación que incluya FoxP3+, por lo que pareció de difícil interpretación dada la relevancia del factor de transcripción FoxP3 en el mecanismo de supresión celular.

Respecto a la producción de perforina expresada en porcentaje de células que las expresan, no se apreciaron diferencias entre las Breg de ningún grupo. Midiendo la producción de perforinas por MFI (*single cell level*), Se evidenció una expresión de perforina significativamente mayor medida por MFI en el grupo ECTL respecto al NEC al identificar los Breg según positividad a CD19+CD25+ (p=0.012) y a CD19+FoxP3+ (p=0.005).

ECNL Vs ECTL

ECNL vs ECTL	CD19+	CD19+ CD25+ FoxP3+	%Perf Breg	MFI Perf Breg	CD19+ CD25+	%Perf CD25+	MFI Perf CD25+	CD19+ FoxP3+	%Perf	MFI
U de Mann-Whitney	56,5	52	61	36	39,5	45	34	62	44	40
Sig. Exacta (bilateral)	0,38	0,25	0,54	0,11	0,05*	0,12	0,05*	0,58	0,11	0,11

*p<0.05

Tabla 33: Diferencias en Breg entre ECNL y ECTL.

Al identificar los Breg por CD19+CD25+, se apreció una mayor proporción de Breg en el grupo ECTL con significación estadística ($p=0.05$), no alcanzando la significación en las otras subpoblaciones de Breg. Se evidenció un aumento en el MFI de las perforinas intracelulares en el grupo ECNL respecto al ECTL al identificar las Breg como CD19+CD25+ ($p=0.05$) mientras que en la subpoblaciones CD19+CD25+FoxP3+ y CD19+FoxP3+ no se alcanzó la significación pero existió una manifiesta tendencia ($p=0.11$ en ambas subpoblaciones). No hubo diferencias en la expresión porcentual de perforina, pero se describió una tendencia similar a la descrita en el MFI en las subpoblaciones CD19+CD25+ ($p=0.12$) y CD19+FoxP3+ ($p=0.11$).

Diferencias globales y conclusión

En los resultados se apreció una tendencia estable pero no globalmente significativa (sólo en alguna subpoblación puntual) a que los pacientes del grupo ECTL tuvieran un porcentaje mayor de Breg que los pacientes del grupo ECNL. Respecto a la expresión de perforina por las subpoblaciones Breg, se apreció una mayor actividad en el grupo ECNL respecto al ECTL, en prácticamente todas las subpoblaciones de células Breg. La expresión de perforina a nivel celular de forma global fue mayor en ambos grupos de

pacientes con EC respecto a los controles sanos en las tres subpoblaciones de Breg, lo que indicaría, que a pesar de tratarse de subpoblaciones minoritarias en sangre, se encuentran altamente activadas.

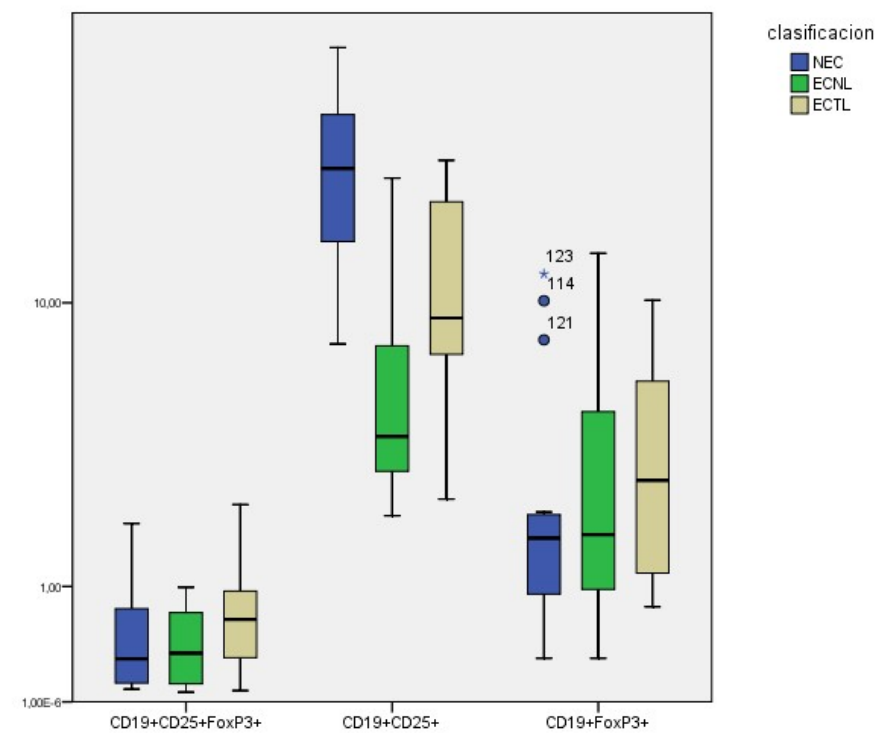


Figura 11: Citometría de flujo multiparamétrica de subpoblaciones de Breg.

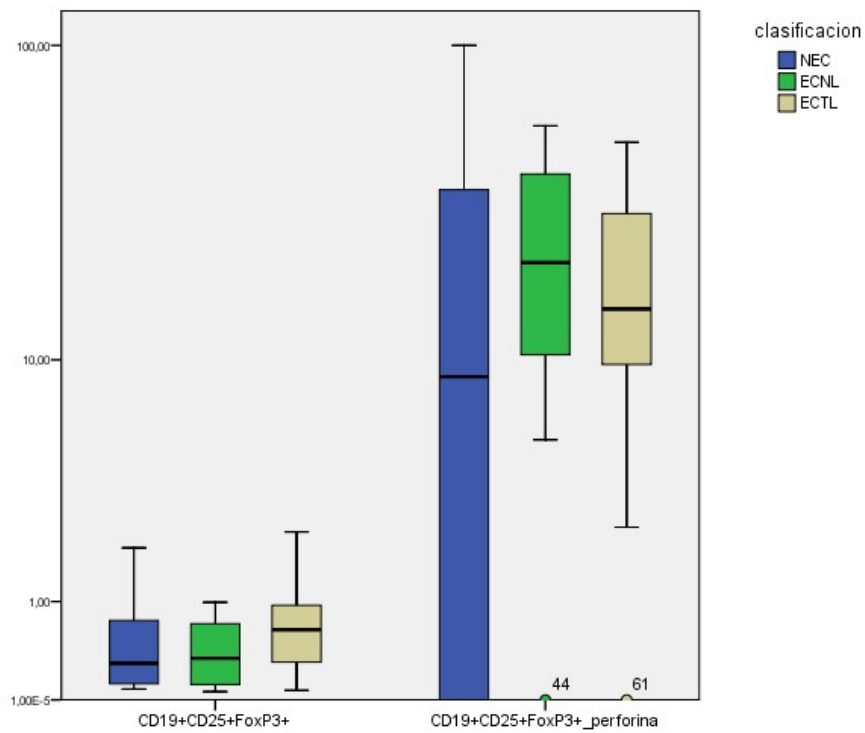


Figura 12: Citometría de flujo multiparamétrica de CD19+CD25+FoxP3+ y su expresión de perforina.

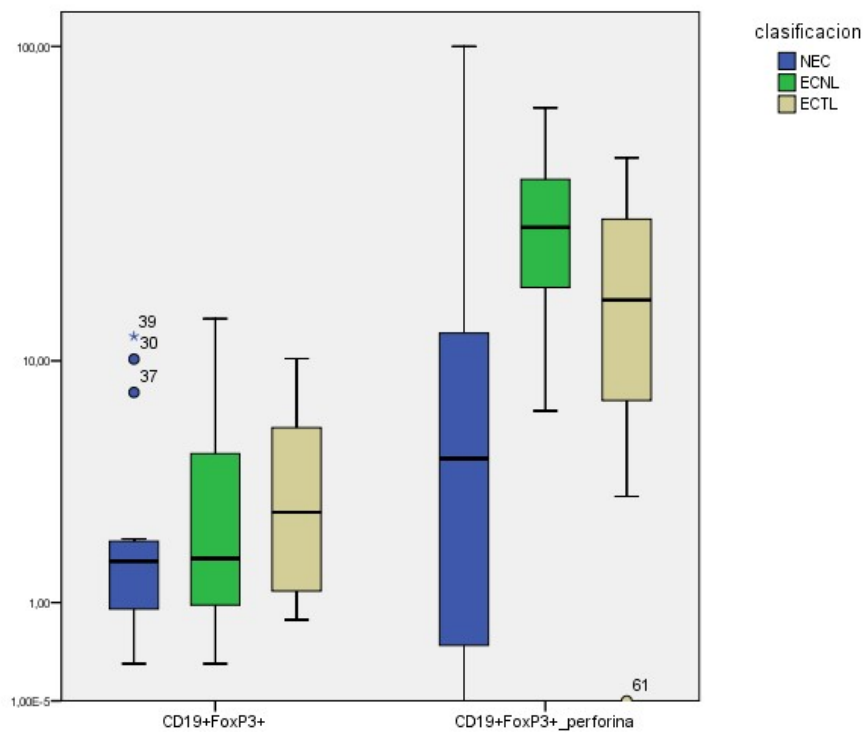


Figura 13: Citometría de flujo multiparamétrica de CD19+FoxP3+ y su expresión de perforina.

4.4.3.- COMPARACIÓN ENTRE CANTIDAD Y ACTIVIDAD DE TREG- CD8

El último linfocito regulador que se valoró en este estudio fue el TregCD8+. Para ello se realizó un estudio descriptivo de dos subpoblaciones de este tipo de linfocitos en función de su diferenciación por positividad a CD8+CD25+FoxP3+ o CD8+CD25+^{high}. Fue evaluada la actividad de estos linfocitos reguladores en función del porcentaje celular de expresión de perforinas y por el parámetro numérico cuantitativo de intensidad media fluoroscópica (MFI).

Células TregCD8+	NEC	ECNL	ECTL
CD8+CD25+FoxP3+	0.15±0.15 0.11 (0.03-0.26)	0.16±0.19 0.07 (0.45-0.24)	0.24±0.23 0.13 (0.06-0.5)
%Perf Breg	23.06±27.77 20 (0-34.37)	43.65±36.72 43.18 (7.86-76.67)	19.11±19.76 15.34 (1.09-31.82)
MFI Perf Breg	17.02±19.5 13.04 (0-26.85)	241.21±148.31 263.72^a (96.98-350.04)	227.85±345.12 47.27 (1.94-343.12)
CD8+CD25+	16.75±26 6.08 (3.54-14.44)	2.67±5.03 0.56^a (0.41-1.05)	10.91±16.19 3.27 (0.6-19.57)
%Perf	6.54±8.46 3.14 (2.61-6.122)	24.88±19.74 20.18^a (8.2-40.85)	17.58±22.09 7.07 (0.68-36.5)
MFI Perf	23.21±15.59 20.32 (11.37-30.71)	231.37±370.69 150.37^a (82.59-188.21)	340.62±781.4 105.89^a (14.31-221)
CD8+FoxP3+	ND	0.68±0.71 0.33 (0.16-73.92)	1.87±1.9 1.21 (0.7-3.1)
% Perf	ND	52.52±27.20 46 (37.7-73.92)	36.35±26.22 29.83 (10.29-60.72)
MFI Perf	ND	397.37±339.59 279.4 (226.45-423.79)	278.49±386.57 117.9^b (60.27-311.56)

^a Diferencias con NEC

^b Diferencias con ECNL

ND: no determinado.

Tabla 34: Porcentaje de subtipos de linfocitos TregCD8+ sobre el total de linfocitos CD8+ y expresión individualizada de perforina de estas subpoblaciones.

NEC Vs ECNL

NEC vs ECNL	CD8+ CD25+ FoxP3+	%Perf Treg	MFI Perf Treg	CD8+ CD25+	%Perf CD25+	MFI Perf CD25+
U de Mann-Whitney	107,5	69	15	28	35	18
Sig. exacta (bilateral)	0,99	0,09	<0.001*	<0,001*	<0,001*	<0,001*

*p<0.05

Tabla 35: Diferencias en TregCD8+ entre NEC y ECNL.

Los pacientes del grupo ECNL presentaron un porcentaje significativamente menor de TregCD8+ respecto a los controles al identificarse por CD8+CD25+ ($p<0.001$), sin apreciarse diferencias en la identificación por CD8+CD25+FoxP3+ ($p=0.991$). Se apreció que los pacientes del grupo ECNL presentaron mayor porcentaje de expresión de perforinas y MFI al identificar los TregCD8+ mediante CD8+CD25+ ($p<0.001$) mientras que se describió una tendencia al identificarlos por su subpoblación CD8+CD25+FoxP3+ ($p=0.09$).

NEC Vs ECTL

NEC vs ECTL	CD8+ CD25+ FoxP3+	%Perf Treg	MFI Perf Treg	CD8+CD25+	%Perf CD25+	MFI Perf CD25+
U de Mann-Whitney	83	104,5	66	69	97	59
Sig. exacta (bilateral)	0,29	0,89	0,07	0,1	0,66	0,03*

*p<0.05

Tabla 36: Diferencias en TregCD8+ entre NEC y ECTL.

No se apreciaron diferencias entre los grupos NEC y ECTL respecto al porcentaje de TregCD8+ al identificarlos por CD8+CD25+ ($p=0.299$) aunque se describió una tendencia al identificarlos por CD8+CD25+FoxP3+ ($p=0.104$).

Existió una mayor expresión de perforina medida por MFI en el grupo ECTL al identificar los TregCD8+ por CD8+CD25+ ($p=0.03$) y una tendencia cercana a la significación estadística en la subpoblación CD8+CD25+FoxP3+ ($p=0.07$).

ECNL Vs ECTL

ECNL vs ECTL	CD8+ CD25+ FoxP3+	%Perf Treg	MFI Perf Treg	CD8+ CD25+	%Perf CD25+	MFI Perf CD25+	CD8+ FoxP3+	%Perf FoxP3+	MFI Perf FoxP3+
U de Mann-Whitney	55	43,5	49,5	39	50	65,5	39	47	37
Sig. exacta (bilateral)	0,33	0,1	0,20	0,06	0,21	0,72	0,06	0,15	0,04*

* $p<0.05$

Tabla 37: Diferencias en TregCD8+ entre ECNL y ECTL.

La proporción de TregCD8+ fue mayor en el grupo ECTL respecto al ECNL en las tres subpoblaciones aisladas CD8+CD25+FoxP3+ (0.24 frente a 0.16), CD8+CD25+ (3.27 frente a 0.56) y CD8+FoxP3+ (1.21 frente a 0.33). No se apreciaron diferencias significativas pero sí una fuerte tendencia rozando la significación en las subpoblaciones CD8+CD25+ ($p=0.06$) y CD8+FoxP3+ ($p=0.06$).

En el grupo ECTL se aprecia una menor expresión de perforina intracelular respecto al grupo ECNL, que alcanza la significación estadística en el MFI de los TregCD8+ identificados por CD8+FoxP3+ ($p=0.04$). En la determinación porcentual de expresión de perforina se apreció una tendencia importante a favor del grupo ECNL en las subpoblaciones CD8+CD25+FoxP3+ ($p=0.1$), CD8+CD25+ ($p=0.21$) y CD8+FoxP3+ ($p=0.15$).

Diferencias globales y conclusión

Nuevamente se apreció una tendencia general, en el límite de la significación estadística, a que los pacientes del grupo ECTL presentasen un porcentaje mayor de TregCD8+ que los pacientes del grupo ECNL. Esta tendencia se describe en todas las subpoblaciones de TregCD8+ y es simétrica a las halladas en las otras células reguladoras (Treg y Breg). De forma también simétrica al resto de reguladoras, se aprecia una tendencia en ocasiones significativa a que la expresión de perforina sea mayor en el grupo ECNL respecto al ECTL en relación al grado de activación celular. No hubo diferencias entre ambos grupos de pacientes con EC respecto a los controles sanos respecto al porcentaje de TregCD8+. El grado de expresión celular de perforina fue muy variable en el grupo de controles sanos, sin grandes diferencias respecto a los grupos ECTL y ECNL.

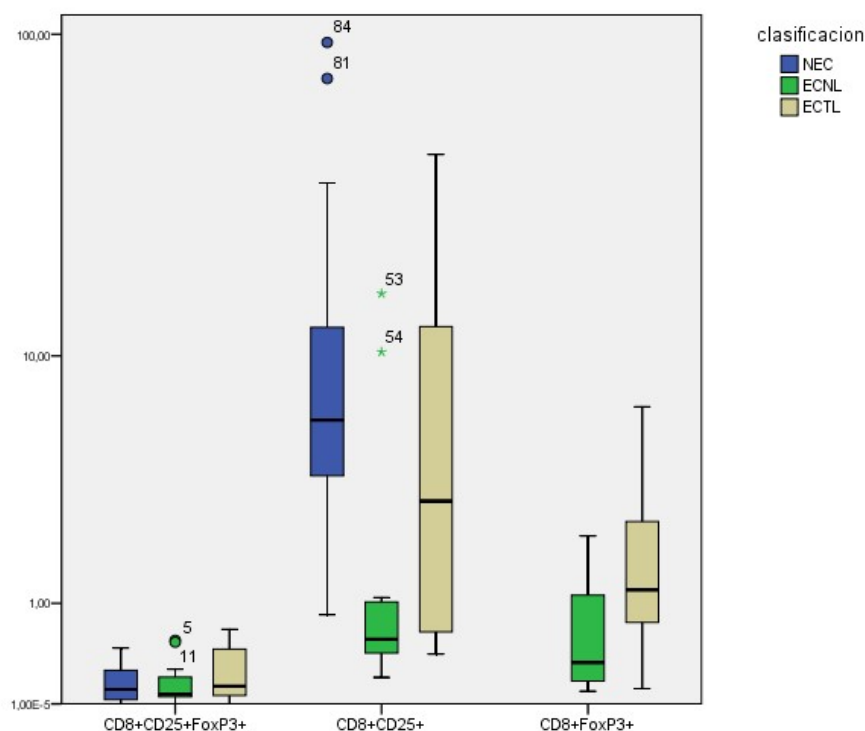


Figura 14: Citometría de flujo multiparamétrica de subpoblaciones de TregCD8+.

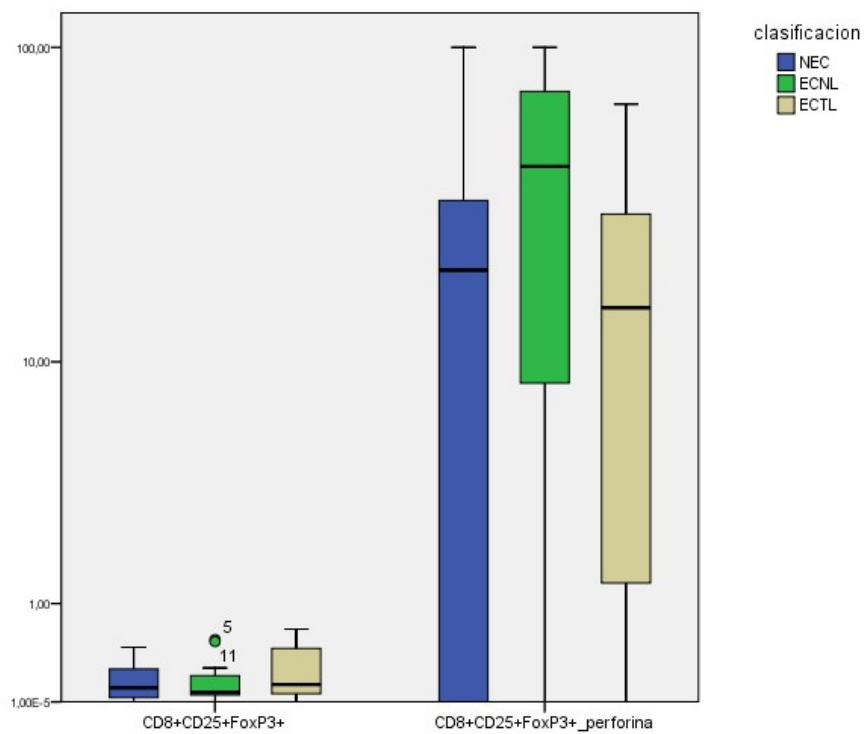


Figura 15: Citometría de flujo multiparamétrica de CD8+CD25h+FoxP3+ y su expresión de perforina.

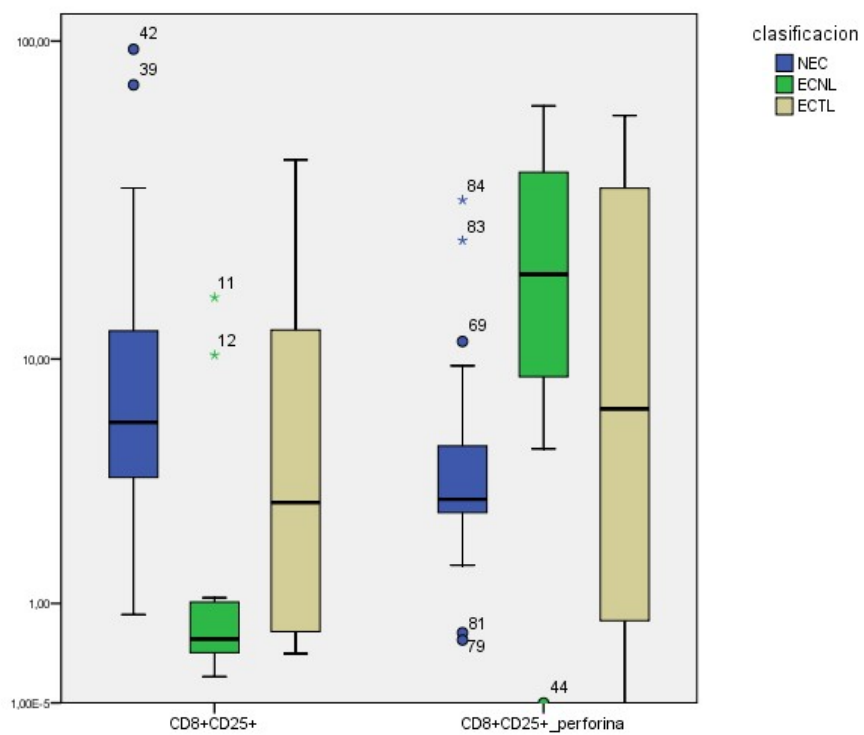


Figura 16: Citometría de flujo multiparamétrica de CD8+CD25+ y su expresión de perforina.

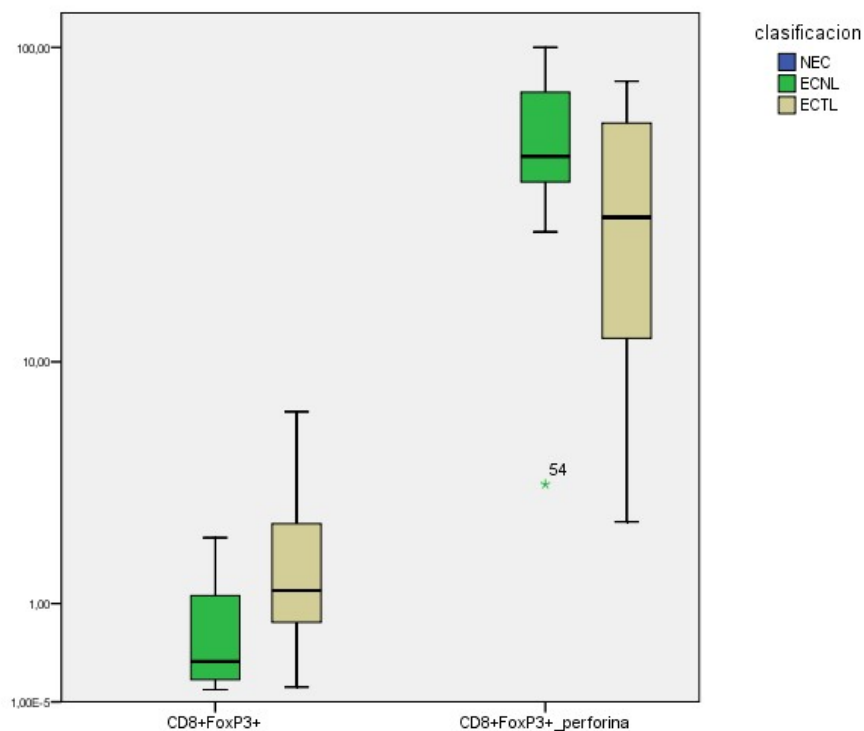


Figura 17: Citometría de flujo multiparamétrica de CD8+FoxP3+ y su expresión de perforina.

4.5.- DISCUSIÓN

Los linfocitos reguladores, ya sean Treg, Breg o TregCD8+, son células fundamentales en la regulación de la inflamación y en su finalización cuando la causa originaria cesa. Esto queda demostrado en modelos de enfermedades en las que hay ausencia de FoxP3 como es el síndrome de desregulación autoinmune ligado al cromosoma X con poliendocrinopatía (IPEX), que se caracteriza por enteritis inflamatoria de difícil control además de diabetes mellitus y eczema (123). En esta patología existe una alteración funcional de las células reguladoras en relación a mutaciones de FoxP3 que motivan la aparición de diferentes patologías autoinmunitarias entre las que destaca la

enteropatía autoinmune con atrofia vellositaria y que ha presentado respuesta positiva a la terapia con trasplante alogénico de precursores hematopoyéticos (124). Las células reguladoras son por tanto, elementos celulares de gran trascendencia en la finalización de la respuesta inflamatoria y en la aparición de patologías autoinmunes e incluso tumorales (125).

Este estudio es el primero publicado, en nuestro conocimiento actual, que ha analizado las diferencias en el número proporcional y en la actividad de los linfocitos reguladores en un subgrupo de pacientes con EC y tendencia a la linfopenia respecto a otro grupo de EC sin dicha propensión. A pesar de que el tamaño muestral de este estudio haya sido limitado, creemos que es un valioso punto de partida para desarrollar futuros estudios básicos que valoren las características numéricas y funcionales de las distintas células reguladoras y de otros tipos de linfocitos.

Incluso a día de hoy existe el reto de definir inmunitariamente a los linfocitos reguladores. La ausencia de un marcador específico para estas células limitó su determinación y generó gran controversia en los estudios que valoraban sus cifras numéricas o de actividad en el pasado (126). La identificación y aplicación de la determinación de FoxP3 para identificar linfocitos reguladores ha sido un paso importante a la hora de una selección más exacta de los Treg, los Breg y los TregCD8+ por ser su marcador más característico (127). No obstante, incluso en ausencia de determinación de FoxP3, es posible aislar los diferentes tipos de linfocitos reguladores de diferentes maneras en función de otros anticuerpos seleccionados en la citometría de flujo multiparamétrica.

En este estudio una primera valoración de los resultados permite advertir una importante coincidencia de los mismos a pesar de distintos métodos citométricos de identificación de un mismo linfocito regulador. No obstante, en ocasiones no se obtuvo una homogeneidad total al comparar la cantidad y la actividad de las diferentes subpoblaciones. Cuando esto ocurrió, la presencia de FoxP3 en el método de identificación de la subpoblación linfocitaria mediante citometría de flujo fue valorado como un patrón de calidad frente a las demás determinaciones y fue tenido en cuenta en caso de resultados no complementarios entre subpoblaciones de una misma célula reguladora de acuerdo a otros estudios previos (128–130).

El número y la actividad de las células reguladoras se modifican ampliamente en función de la actividad de la enfermedad en el paciente. Varios estudios demuestran que durante la actividad de la EC o de la CU, el número de Treg disminuye en sangre periférica existiendo la teoría de que aumenta en los tejidos afectados por migración linfocitaria en un intento de controlar la inflamación (131), mientras que esa tendencia se invierte durante los periodos de remisión entre brotes (132). Por lo tanto fue vital para una correcta calidad metodológica el desarrollar unos criterios de selección homogéneos de los pacientes con EC respecto a la actividad de la enfermedad para eliminar la posibilidad de mezclar ambientes metabólicos e inmunológicos totalmente opuestos.

Se ha determinado en trabajos previos que los linfocitos Treg de pacientes con EC no linfopénica son funcionantes *ex vivo* pero que en el transcurso de un brote inflamatorio no son capaces de detener esta respuesta posiblemente por alteraciones funcionales de los propios linfocitos o por la presencia masiva de citoquinas coestimuladoras (133,134). En nuestro estudio se ha tratado de valorar la presencia numérica de las células reguladoras pero también su activación, midiéndola por la expresión de perforina, para tratar de buscar diferencias entre los dos grupos de pacientes con EC.

En lo relativo al conteo proporcional de células reguladoras, en este estudio se ha apreciado que existe una tendencia global, que en muchas ocasiones presenta significación estadística, a que en el grupo de ECTL exista un aumento en el porcentaje de linfocitos reguladores respecto al grupo ECNL. En el caso de los Treg y Breg de forma estadísticamente significativa en algunas determinaciones (CD4+CD25^{high} en Treg y CD19+CD25+ en Breg) y en el caso de los TregCD8+ y del resto de subpoblaciones de Treg y Breg mediante una tendencia acusada, se apreció que en el grupo de ECTL existió un aumento en el porcentaje de linfocitos reguladores respecto al grupo ECNL en sangre periférica. Al presentar los controles del grupo NEC una alta variabilidad en su proporción de reguladores, no hubo diferencias entre los grupos de pacientes con EC respecto a estos controles como las ya descritas entre ECTL y ECNL.

De forma significativa en algunas determinaciones de Treg (CD4+CD25+), Breg (CD19+CD25+) y TregCD8+ (CD8+FoxP3+) pero con una tendencia estable y clara en el resto de subpoblaciones, se apreció una expresión intracelular de

perforina en los linfocitos reguladores disminuida en el grupo de pacientes ECTL respecto al grupo ECTL. Como ya se ha explicado previamente, la expresión de perforina intracelular es un marcador directo de activación celular en el caso de las células reguladoras (135,136). Esta expresión tiene efectos citotóxicos ya que las células reguladoras utilizan la vía granzima-perforina para suprimir otras células inmunitarias efectoras a través de la creación de poros transmembrana (137,138). El hecho de que en este estudio, la expresión intracelular de perforina en el grupo ECTL fuera menor que en el ECNL indica un menor grado global de activación de las células reguladoras de este grupo en situación de ausencia de actividad de la enfermedad.

Esta doble diferencia en el grupo ECTL: mayor proporción de reguladores pero con menor nivel funcional expresado como perforina intracelular se podría explicar como un “*upregulation*” de las células reguladoras. Esto ocurriría en respuesta a la hipofunción de estos linfocitos mediante un aumento en la producción de citoquinas que estimulasen la producción de linfocitos reguladores (como por ejemplo IL-2) para suplir numéricamente lo que cualitativamente no serían capaces de realizar por déficit de activación (139). Esta hipótesis está en línea con otros estudios que plantean una alteración funcional de los reguladores en la EC, planteando una disfunción en sus capacidades regulatorias como mecanismo de ausencia del control de la inflamación y por lo tanto de la cronicidad de la actividad de la enfermedad (140).

A pesar de todos los avances médicos que se han dado en los últimos veinte años en la terapéutica de la EC, aún existe un grupo de pacientes con escasa o nula respuesta a terapia IMM o biológica y que presentan un curso clínico grave con numerosas recaídas. Estos pacientes a menudo requieren cirugías agresivas con secuelas potencialmente graves y tratamientos corticoideos duraderos que condicionan la aparición de importantes efectos secundarios. Uno de los recursos terapéuticos que se encuentra en estudio en la actualidad es la administración de linfocitos reguladores de individuos sanos para combatir la actividad de la enfermedad (141,142) y así suplir las carencias funcionales de los linfocitos reguladores propios. El hecho de describir un subgrupo de pacientes con EC que presentan un déficit de actividad estable, medido por la expresión de perforina con un consecuente defecto funcional de los linfocitos reguladores abre la puerta a posibles terapias inmunitarias específicas. Es un hecho cierto que desconocemos aún muchos aspectos de la inmunología de la EC, existiendo la teoría de que la EC fuera un estadio final clínico al que se pudiera llegar por varios defectos primarios del sistema inmunológico (143,144). Es clave por lo tanto conocer las características inmunológicas específicas de los posibles diferentes fenotipos de la EC para desarrollar futuras líneas de terapia específicas.

Por lo tanto podemos concluir que el grupo de pacientes ECTL presentó una mayor proporción de células reguladoras respecto a los pacientes ECNL ya fuera como tendencia o con diferencias significativas que además presentaban menor activación celular medida por la expresión intracelular de perforina. Estos resultados estuvieron limitados en la significación estadística por el

tamaño muestral utilizado en este trabajo, por lo que nuevos estudios serían necesarios para confirmar la tendencia que se ha detectado y para valorar *in vivo* e *in vitro* la funcionalidad de las células reguladoras en los pacientes con EC y tendencia a la linfopenia primaria.

5.- CONCLUSIONES FINALES DE ESTA OBRA

Tras realizar una presentación de los resultados de los dos estudios (clínico y básico) que se han planteado en esta obra y tras una discusión pormenorizada de ambos, se proponen finalmente estas conclusiones:

1.- Existe un 20% de pacientes con Enfermedad de Crohn (EC) que reúnen criterios de tendencia a la linfopenia primaria (ECTL). Estos pacientes tienen un debut clínico más tardío que el resto de pacientes con EC como característica basal diferencial.

2.- Los pacientes con ECTL tienen una mayor probabilidad de ser sometidos a cirugías resectivas que el resto de pacientes con EC. Las tasas acumuladas de inicio de tratamiento con Inmunomoduladores (IMM) y con fármacos biológicos no son significativamente diferentes respecto a los pacientes con enfermedad de Crohn no linfopénica (ECNL).

3.- Los pacientes ECTL tienen una probabilidad mayor de presentar mielotoxicidad como evento adverso de los IMM tiopurínicos. No obstante, se ha demostrado que una estrategia de control clínico-analítica igual a la realizada en el resto de pacientes es segura y efectiva dado que evita la aparición de infecciones relevantes.

4.- En ausencia de actividad clínica, los pacientes ECTL presentan una proporción de células reguladoras (Treg, Breg y TregCD8+) en sangre periférica mayor que el resto de pacientes con EC.

5.- Los linfocitos reguladores de los pacientes ECTL presentan en sangre periférica un menor nivel de activación medido por la expresión intracelular de perforina respecto a los pacientes ECNL en remisión clínica de la enfermedad.

6.- Estos resultados avalan la existencia de un fenotipo ECTL basado en unas características basales diferenciadas, una distinta evolución clínica y unas características inmunológicas independientes que obligan a la detección precoz de estos pacientes para un seguimiento específico.

7.- Son necesarios nuevos estudios clínicos para comprobar la relevancia que la tendencia a la linfopenia primaria en la EC tiene y la respuesta de estos pacientes ECTL a manejos farmacológicos más dinámicos e individualizados. De igual manera se requieren estudios adicionales para ampliar el conocimiento inmunológico del fenotipo ECTL con el objetivo de desarrollar futuras terapias incluyendo tratamientos con células reguladoras.

6.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Fernández A, Hernández V, Martínez-Ares D, Sanromán L, de Castro ML, Pineda JR, et al. Incidence and phenotype at diagnosis of inflammatory bowel disease. Results in Spain of the EpiCom study. *Gastroenterol y Hepatol*. 2015 Nov;38(9):534–40.
2. Spinelli A, Sacchi M, Fiorino G, Danese S, Montorsi M. Risk of postoperative recurrence and postoperative management of Crohn's disease. *World J Gastroenterol*. 2011 Jul 21;17(27):3213–9.
3. Ardizzone S, Bianchi Porro G. Biologic therapy for inflammatory bowel disease. *Drugs*. 2005;65(16):2253–86.
4. Yadav V, Varum F, Bravo R, Furrer E, Bojic D, Basit AW. Inflammatory bowel disease: exploring gut pathophysiology for novel therapeutic targets. *Transl Res*. 2016 Oct;176:38–68.
5. Yamamoto T, Watanabe T. Surgery for luminal Crohn's disease. *World J Gastroenterol*. 2014 Jan 7;20(1):78–90.
6. Vigo MS, Grobas JP, Díaz MB, Freire MC, Alejandro AB, Dovigo AG, et al. [Factors affecting the postoperative recurrence of Crohn's disease. New controversies with one centre's experience]. *Cirugía española*. 2011 May ;89(5):290–9.
7. Mathew CG. New links to the pathogenesis of Crohn disease provided by genome-wide association scans. *Nat Rev Genet*. 2008;9(1):9–14.
8. Hong SN, Park C, Park SJ, Lee CK, Ye BD, Kim YS, et al. Deep resequencing of 131 Crohn's disease associated genes in pooled DNA confirmed three reported variants and identified eight novel variants. *Gut*. 2016 May;65(5):788–96.
9. Wildenberg ME, Koelink PJ, Diederken K, Te Velde AA, Wolfkamp SCS, Nuij VJ, et al. The ATG16L1 risk allele associated with Crohn's disease results in a Rac1-dependent defect in dendritic cell migration that is corrected by thiopurines. *Mucosal Immunol*. 2016 Jul 20
10. Boada-Romero E, Serramito-Gómez I, Sacristán MP, Boone DL, Xavier RJ, Pimentel-Muiños FX. The T300A Crohn's disease risk polymorphism impairs function of the WD40 domain of ATG16L1. *Nat Commun*. 2016;7:11821.
11. Bianco AM, Girardelli M, Tommasini A. Genetics of inflammatory bowel disease from multifactorial to monogenic forms. *World J Gastroenterol* [Internet]. 2015 Nov 21;21(43):12296–310.
12. Li J-H, Wu N, Yang H-M, Tang H-B, Bao D-P, Ji J-M. Interaction between

- STAT3 gene polymorphisms and smoking on Crohn's disease susceptibility: a case-control study in a Chinese Han population. *Inflamm Res*. 2016 Jul;65(7):573–8.
13. Ryan BM, Wolff RK, Valeri N, Khan M, Robinson D, Paone A, et al. An analysis of genetic factors related to risk of inflammatory bowel disease and colon cancer. *Cancer Epidemiol*. 2014 Oct;38(5):583–90.
 14. To N, Gracie DJ, Ford AC. Systematic review with meta-analysis: the adverse effects of tobacco smoking on the natural history of Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2016 Mar;43(5):549–61.
 15. Nunes T, Etchevers MJ, García-Sánchez V, Ginard D, Martí E, Barreiro-de Acosta M, et al. Impact of Smoking Cessation on the Clinical Course of Crohn's Disease Under Current Therapeutic Algorithms: A Multicenter Prospective Study. *Am J Gastroenterol*. 2016 Mar;111(3):411–9.
 16. Charlebois A, Rosenfeld G, Bressler B. The Impact of Dietary Interventions on the Symptoms of Inflammatory Bowel Disease: A Systematic Review. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2016 Jun 10;56(8):1370–8.
 17. Uranga JA, López-Miranda V, Lombó F, Abalo R. Food, nutrients and nutraceuticals affecting the course of inflammatory bowel disease. *Pharmacol Rep*. 2016 Aug ;68(4):816–26.
 18. Long MD, Kappelman MD, Martin CF, Chen W, Anton K, Sandler RS. Role of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs in Exacerbations of Inflammatory Bowel Disease. *J Clin Gastroenterol*. 2016 Feb;50(2):152–6.
 19. Kvasnovsky CL, Aujla U, Bjarnason I. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and exacerbations of inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol*. 2015 Mar;50(3):255–63.
 20. Mittermaier C, Dejaco C, Waldhoer T, Oefflerbauer-Ernst A, Miehsler W, Beier M, et al. Impact of depressive mood on relapse in patients with inflammatory bowel disease: a prospective 18-month follow-up study. *Psychosom Med* ;66(1):79–84.
 21. Alhagamhmad MH, Day AS, Lemberg DA, Leach ST. An overview of the bacterial contribution to Crohn disease pathogenesis. *J Med Microbiol*. 2016 Aug 8;
 22. Hedin C, van der Gast CJ, Rogers GB, Cuthbertson L, McCartney S, Stagg AJ, et al. Siblings of patients with Crohn's disease exhibit a biologically relevant dysbiosis in mucosal microbial metacommunities. *Gut*. 2016 Jun;65(6):944–53.
 23. Wright EK, Kamm MA, Teo SM, Inouye M, Wagner J, Kirkwood CD. Recent advances in characterizing the gastrointestinal microbiome in Crohn's disease: a systematic review. *Inflamm Bowel Dis*. 2015

Jun;21(6):1219–28.

24. Hoarau G, Mukherjee PK, Gower-Rousseau C, Hager C, Chandra J, Retuerto MA, et al. Bacteriome and Mycobiome Interactions Underscore Microbial Dysbiosis in Familial Crohn's Disease. *MBio*. 2016;7(5).
25. Tambuwala MM. Natural Nuclear Factor Kappa Beta Inhibitors: Safe Therapeutic Options for Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2016 Mar;22(3):719–23.
26. Cassano C, Torsoli A, Perlmann P. [Ulcerative colitis and Crohn's disease of the colon. Problems of diagnosis and therapy. Immunological aspects]. *Minerva Med*. 1972 Dec 8;63(88):4813–4.
27. Michielan A, D'Inca R. Host-microbiome interaction in Crohn's disease: A familiar or familial issue? *World J Gastrointest Pathophysiol* [Internet]. 2015 Nov 15;6(4):159–68.
28. Michielan A, D'Inca R. Intestinal Permeability in Inflammatory Bowel Disease: Pathogenesis, Clinical Evaluation, and Therapy of Leaky Gut. *Mediators Inflamm*. 2015;2015:628157.
29. Øyri SF, Múzes G, Sipos F. Dysbiotic gut microbiome: A key element of Crohn's disease. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2015 Dec;43:36–49.
30. Haag L-M, Siegmund B. Intestinal Microbiota and the Innate Immune System - A Crosstalk in Crohn's Disease Pathogenesis. *Front Immunol*. 2015;6:489.
31. Li J, Ueno A, Fort Gasia M, Luider J, Wang T, Hirota C, et al. Profiles of Lamina Propria T Helper Cell Subsets Discriminate Between Ulcerative Colitis and Crohn's Disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2016 Aug;22(8):1779–92.
32. Ueno A, Ghosh A, Hung D, Li J, Jijon H. Th17 plasticity and its changes associated with inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2015 Nov 21;21(43):12283–95.
33. Owaga E, Hsieh R-H, Mugendi B, Masuku S, Shih C-K, Chang J-S. Th17 Cells as Potential Probiotic Therapeutic Targets in Inflammatory Bowel Diseases. *Int J Mol Sci*. 2015;16(9):20841–58.
34. Withers DR, Hepworth MR, Wang X, Mackley EC, Halford EE, Dutton EE, et al. Transient inhibition of ROR- γ t therapeutically limits intestinal inflammation by reducing TH17 cells and preserving group 3 innate lymphoid cells. *Nat Med*. 2016 Mar;22(3):319–23.
35. Jiang W, Su J, Zhang X, Cheng X, Zhou J, Shi R, et al. Elevated levels of Th17 cells and Th17-related cytokines are associated with disease activity in patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Res*. 2014

Nov;63(11):943–50.

36. Morikawa H, Sakaguchi S. Genetic and epigenetic basis of Treg cell development and function: from a FoxP3-centered view to an epigenome-defined view of natural Treg cells. *Immunol Rev.* 2014 May;259(1):192–205.
37. Alroqi FJ, Chatila TA. T Regulatory Cell Biology in Health and Disease. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2016 Apr;16(4):27.
38. Hölttä V, Sipponen T, Westerholm-Ormio M, Salo HM, Kolho K-L, Färkkilä M, et al. In Crohn's Disease, Anti-TNF- α Treatment Changes the Balance between Mucosal IL-17, FOXP3, and CD4 Cells. *ISRN Gastroenterol.* 2012;2012:505432.
39. Oka A, Ishihara S, Mishima Y, Tada Y, Kusunoki R, Fukuba N, et al. Role of regulatory B cells in chronic intestinal inflammation: association with pathogenesis of Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2014 Feb;20(2):315–28.
40. Sarabayrouse G, Bossard C, Chauvin J-M, Jarry A, Meurette G, Quévrain E, et al. CD4CD8 α lymphocytes, a novel human regulatory T cell subset induced by colonic bacteria and deficient in patients with inflammatory bowel disease. *PLoS Biol.* 2014 Apr;12(4):e1001833.
41. Brandhorst G, Petrova DT, Weigand S, Eberle C, von Ahsen N, Schmitz J, et al. Lack of correlation between Treg quantification assays in inflammatory bowel disease patients. *World J Gastroenterol.* 2015 Mar 21;21(11):3325–9.
42. Poniedziałek B, Rzymiski P, Karczewski J. Increased apoptosis of regulatory T cells in Crohn's disease. *Hepatogastroenterology.* 61(130):382–4.
43. Sloan S, Maxwell P, Salto-Tellez M, Loughrey MB. FOXP3+ regulatory T-cell counts correlate with histological response in Crohn's colitis treated with infliximab. *Pathol Int.* 2014 Dec;64(12):624–7.
44. Marks DJB, Rahman FZ, Sewell GW, Segal AW. Crohn's disease: an immune deficiency state. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2010 Feb;38(1):20–31.
45. Blandizzi C, Gionchetti P, Armuzzi A, Caporali R, Chimenti S, Cimaz R, et al. The role of tumour necrosis factor in the pathogenesis of immune-mediated diseases. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 27(1 Suppl):1–10.
46. Karlinger K, Györke T, Makö E, Mester A, Tarján Z. The epidemiology and the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Eur J Radiol.* 2000 Sep;35(3):154–67.
47. Ray G. Inflammatory bowel disease in India - Past, present and future.

- World J Gastroenterol. 2016 Sep 28;22(36):8123–36.
48. Cosnes J, Gower-Rousseau C, Seksik P, Cortot A. Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*. 2011 May;140(6):1785–94.
 49. Maté Jiménez J, Pajares Garcia JM, Pérez-Miranda M. [Epidemiology of inflammatory bowel disease: geographic distribution and environmental factors]. *Rev española enfermedades Dig organo Of la Soc Española Patol Dig*. 1994 Jul 86(1):533–9.
 50. Mayberry JF, Rhodes J. Epidemiological aspects of Crohn's disease: a review of the literature. *Gut*. 1984 Aug;25(8):886–99.
 51. Silverberg MS, Satsangi J, Ahmad T, Arnott IDR, Bernstein CN, Brant SR, et al. Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. *Can J Gastroenterol*. 2005 Sep;19 Suppl A:5A–36A.
 52. Ardizzone S, Puttini PS, Cassinotti A, Porro GB. Extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease. *Dig Liver Dis*. 2008 Jul;40 Suppl 2:S253-9.
 53. Hagen JW, Swoger JM, Grandinetti LM. Cutaneous Manifestations of Crohn Disease. *Dermatol Clin*. 2015 Jul;33(3):417–31.
 54. Woo VL. Oral Manifestations of Crohn's Disease: A Case Report and Review of the Literature. *Case Rep Dent*. 2015;2015:830472.
 55. Lee JM, Lee K-M. Endoscopic Diagnosis and Differentiation of Inflammatory Bowel Disease. *Clin Endosc*. 2016 Jul;49(4):370–5.
 56. Chen M, Shen B. Endoscopic Therapy in Crohn's Disease: Principle, Preparation, and Technique. *Inflamm Bowel Dis*. 2015 Sep;21(9):2222–40.
 57. Jesuratnam-Nielsen K, Løgager VB, Rezanavaz-Gheshlagh B, Munkholm P, Thomsen HS. Plain magnetic resonance imaging as an alternative in evaluating inflammation and bowel damage in inflammatory bowel disease--a prospective comparison with conventional magnetic resonance follow-through. *Scand J Gastroenterol*. 2015 May;50(5):519–27.
 58. Choi SH, Kim KW, Lee JY, Kim K-J, Park SH. Diffusion-weighted Magnetic Resonance Enterography for Evaluating Bowel Inflammation in Crohn's Disease: A Systematic Review and Meta-analysis. *Inflamm Bowel Dis*. 2016 Mar;22(3):669–79.
 59. Stanley E, Moriarty HK, Cronin CG. Advanced multimodality imaging of inflammatory bowel disease in 2015: An update. *World J Radiol [Internet]*. 2016 Jun 28;8(6):571–80.

60. Horsthuis K, Stokkers PCF, Stoker J. Detection of inflammatory bowel disease: diagnostic performance of cross-sectional imaging modalities. *Abdom Imaging*.;33(4):407–16.
61. Zorzi F, Calabrese E, Monteleone G. Pathogenic aspects and therapeutic avenues of intestinal fibrosis in Crohn's disease. *Clin Sci (Lond)*. 2015 Dec;129(12):1107–13.
62. Gecse KB, Brandse JF, van Wilpe S, Löwenberg M, Ponsioen C, van den Brink G, et al. Impact of disease location on fecal calprotectin levels in Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol*. 2015 Jul;50(7):841–7.
63. Schoepfer AM, Beglinger C, Straumann A, Trummeler M, Vavricka SR, Bruegger LE, et al. Fecal calprotectin correlates more closely with the Simple Endoscopic Score for Crohn's disease (SES-CD) than CRP, blood leukocytes, and the CDAI. *Am J Gastroenterol*. 2010 Jan;105(1):162–9.
64. Jones J, Loftus E V, Panaccione R, Chen L-S, Peterson S, McConnell J, et al. Relationships between disease activity and serum and fecal biomarkers in patients with Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2008 Nov;6(11):1218–24.
65. Silverberg MS, Satsangi J, Ahmad T, Arnott IDR, Bernstein CN, Brant SR, et al. Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. *Can J Gastroenterol [Internet]*. 2005 Sep;19 Suppl A:5A–36A.
66. Ueno F, Matsui T, Matsumoto T, Matsuoka K, Watanabe M, Hibi T, et al. Evidence-based clinical practice guidelines for Crohn's disease, integrated with formal consensus of experts in Japan. *J Gastroenterol*. 2013 Jan;48(1):31–72.
67. Ueno F, Matsui T, Matsumoto T, Matsuoka K, Watanabe M, Hibi T, et al. Evidence-based clinical practice guidelines for Crohn's disease, integrated with formal consensus of experts in Japan. *J Gastroenterol*. 2013 Jan;48(1):31–72.
68. TPMT testing before azathioprine therapy? *Drug Ther Bull [Internet]*. 2009 Jan;47(1):9–12.
69. Futami K, Arima S. Role of strictureplasty in surgical treatment of Crohn's disease. *J Gastroenterol*. 2005 Mar;35–9.
70. Milsom JW. Laparoscopic surgery in the treatment of Crohn's disease. *Surg Clin North Am*. 2005 Feb;85(1):25–34; vii.
71. Daperno M, D'Haens G, Van Assche G, Baert F, Bulois P, Maunoury V, et al. Development and validation of a new, simplified endoscopic activity score for Crohn's disease: the SES-CD. *Gastrointest Endosc [Internet]*. 2004 Oct;505–12.

72. Merayo-Chalico J, Rajme-López S, Barrera-Vargas A, Alcocer-Varela J, Díaz-Zamudio M, Gómez-Martín D. Lymphopenia and autoimmunity: A double-edged sword. *Hum Immunol*. 2016 Oct;77(10):921–9.
73. Castelino DJ, McNair P, Kay TW. Lymphocytopenia in a hospital population--what does it signify? *Aust N Z J Med*. 1997 Apr;27(2):170–4
74. Krupica T, Fry TJ, Mackall CL. Autoimmunity during lymphopenia: a two-hit model. *Clin Immunol*. 2006 Aug;120(2):121–8.
75. Khoruts A, Fraser JM. A causal link between lymphopenia and autoimmunity. *Immunol Lett*. 2005 Apr 15;98(1):23–31.
76. Heimann TM, Bolnick K, Aufses AH. Prognostic significance of severe preoperative lymphopenia in patients with Crohn's disease. *Ann Surg*. 1986 Feb;203(2):132–5.
77. Gupta D, Rao VM, Aggarwal AN, Garewal G, Jindal SK. Haematological abnormalities in patients of sarcoidosis. *Indian J Chest Dis Allied Sci*;44(4):233–6.
78. Taflin C, Miyara M, Nochy D, Valeyre D, Naccache J-M, Altare F, et al. FoxP3+ regulatory T cells suppress early stages of granuloma formation but have little impact on sarcoidosis lesions. *Am J Pathol*. 2009 Feb;174(2):497–508.
79. Miyara M, Amoura Z, Parizot C, Badoual C, Dorgham K, Trad S, et al. The immune paradox of sarcoidosis and regulatory T cells. *J Exp Med*. 2006;203(2):359–70.
80. Sweiss NJ, Salloum R, Gandhi S, Ghandi S, Alegre M-L, Sawaqed R, et al. Significant CD4, CD8, and CD19 lymphopenia in peripheral blood of sarcoidosis patients correlates with severe disease manifestations. *PLoS One*. 2010;5(2):e9088.
81. Jones NP, Tsierkezou L, Patton N. Lymphopenia as a predictor of sarcoidosis in patients with uveitis. *Br J Ophthalmol*. 2016 Jan 4
82. Ehrenstein MR, Evans JG, Singh A, Moore S, Warnes G, Isenberg DA, et al. Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNFalpha therapy. *J Exp Med*. 2004 Aug 2;200(3):277–85.
83. Berthelot JM, Maugars Y. Role for suppressor T cells in the pathogenesis of autoimmune diseases (including rheumatoid arthritis). Facts and hypotheses. *Jt Bone Spine*. 2004;71(5):374–80.
84. Anti-TNF drives regulatory T cell expansion by paradoxically promoting membrane TNF-TNF-RII binding in rheumatoid arthritis.
85. Adalimumab reversed a severe lymphopenia in a patient with Crohn's disease. - PubMed - NCBI.

86. Foxp3⁺ regulatory T cells, Th17 effector cells, and cytokine environment in inflammatory bowel disease.
87. Saruta M, Yu QT, Fleshner PR, Mantel PY, Schmidt-Weber CB, Banham AH, et al. Characterization of FOXP3⁺CD4⁺ regulatory T cells in Crohn's disease. *Clin Immunol.* 2007;125(3):281–90.
88. Ricciardelli I, Lindley KJ, Londei M, Quarantino S. Anti tumour necrosis-alpha therapy increases the number of FOXP3 regulatory T cells in children affected by Crohn's disease. *Immunology.* 2008 Oct;125(2):178–83.
89. von Elm E, Altman DG, Egger M, Pocock SJ, Gøtzsche PC, Vandenbroucke JP, et al. The Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE) statement: guidelines for reporting observational studies. *Bull World Health Organ.* 2007 Nov;85(11):867–72.
90. Cleynen I, Boucher G, Jostins L, Schumm LP, Zeissig S, Ahmad T, et al. Inherited determinants of Crohn's disease and ulcerative colitis phenotypes: a genetic association study. *Lancet (London, England).* 2016 Jan 9;387(10014):156–67.
91. Lucendo AJ, Hervías D, Roncero Ó, Lorente R, Bouhmidi A, Angueira T, et al. Epidemiology and temporal trends (2000-2012) of inflammatory bowel disease in adult patients in a central region of Spain. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2014 Dec;26(12):1399–407.
92. De Bie C, Ballet V, Hendriks N, Coenen S, Weyts E, Van Assche G, et al. Smoking behaviour and knowledge of the health effects of smoking in patients with inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2015 Dec;42(11–12):1294–302.
93. Lindner AE. Inflammatory bowel disease in the elderly. *Clin Geriatr Med.* 1999 Aug;15(3):487–97.
94. Juneja M, Baidoo L, Schwartz MB, Barrie A, Regueiro M, Dunn M, et al. Geriatric inflammatory bowel disease: phenotypic presentation, treatment patterns, nutritional status, outcomes, and comorbidity. *Dig Dis Sci.* 2012 Sep;57(9):2408–15.
95. Israeli E, Ryan JD, Shafer L-A, Bernstein CN. Younger age at diagnosis is associated with panenteric, but not more aggressive, Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2014 Jan;12(1):72–79.e1.
96. Xiao Y, Chen B, He Y, Gao X, Huang M, Hu P, et al. [The clinical and endoscopic efficacy of step-up and top-down infliximab therapy in Crohn's disease]. *Zhonghua nei ke za zhi.* 2012 Feb;51(2):100–3.
97. Qiu Y, Chen B-L, Mao R, Zhang S-H, He Y, Zeng Z-R, et al. Early Thiopurines Versus Conventional Step-Care Therapy for Modifying the

- Disease Course of Early Crohn's Disease: A Tertiary Referral Center Cohort Study. *Medicine (Baltimore)*. 2015 Aug;94(31):e1148.
98. Levesque BG, Loftus E V. Initiating azathioprine for Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2012 May;10(5):460–5.
 99. Ngo S, Sauvetre G, Vittecoq O, Lévesque H, Marie I. [Azathioprine-associated severe myelosuppression: indication of routine determination of thiopurine S-methyltransferase variant?]. *La Rev Med interne*. 2011 Jun;32(6):373–6.
 100. Ueno F, Matsui T, Matsumoto T, Matsuoka K, Watanabe M, Hibi T, et al. Evidence-based clinical practice guidelines for Crohn's disease, integrated with formal consensus of experts in Japan. *J Gastroenterol*. 2013 Jan;48(1):31–72.
 101. Dignass A, Van Assche G, Lindsay JO, Lémann M, Söderholm J, Colombel JF, et al. The second European evidence-based Consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: Current management. *J Crohns Colitis*. 2010 Feb;4(1):28–62.
 102. Nanda KS, Cheifetz AS, Moss AC. Impact of antibodies to infliximab on clinical outcomes and serum infliximab levels in patients with inflammatory bowel disease (IBD): a meta-analysis. *Am J Gastroenterol* [Internet]. 2013 Jan;108(1):40–7; quiz 48.
 103. Steenholdt C. Use of infliximab and anti-infliximab antibody measurements to evaluate and optimize efficacy and safety of infliximab maintenance therapy in Crohn's disease. *Dan Med J*. 2013 Apr;60(4):B4616.
 104. Magro F, Santos-Antunes J, Vilas-Boas F, Rodrigues-Pinto E, Coelho R, Ribeiro OS, et al. Crohn's disease outcome in patients under azathioprine: a tertiary referral center experience. *J Crohns Colitis*. 2014 Jul;8(7):617–25.
 105. Qiu Y, Mao R, Zhang S, Li M, Guo J, Chen B, et al. Safety Profile of Thiopurines in Crohn Disease: Analysis of 893 Patient-Years Follow-Up in a Southern China Cohort. *Medicine (Baltimore)*. 2015 Oct;94(41):e1513.
 106. Chaparro M, Ordás I, Cabré E, Garcia-Sanchez V, Bastida G, Peñalva M, et al. Safety of thiopurine therapy in inflammatory bowel disease: long-term follow-up study of 3931 patients. *Inflamm Bowel Dis*. 2013 Jun;19(7):1404–10.
 107. Sun JZ, Xiao WH, Yu L. [Recent research advances on function of CD4+T lymphocytes]. *Zhongguo shi yan xue ye xue za zhi*. 2010 Apr;18(2):544–8.
 108. Knutson KL, Disis ML. Tumor antigen-specific T helper cells in cancer immunity and immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother*. 2005

Aug;54(8):721–8.

109. Nie J, Li YY, Zheng SG, Tsun A, Li B. FOXP3(+) Treg Cells and Gender Bias in Autoimmune Diseases. *Front Immunol*. 2015;6:493.
110. Omenetti S, Pizarro TT. The Treg/Th17 Axis: A Dynamic Balance Regulated by the Gut Microbiome. *Front Immunol*. 2015;6:639.
111. Geremia A, Biancheri P, Allan P, Corazza GR, Di Sabatino A. Innate and adaptive immunity in inflammatory bowel disease. *Autoimmun Rev*. 2014 Jan;13(1):3–10.
112. Luis J, Parias G, Giraldo VED, Velásquez-lopera MM. FOXP3: Controlador maestro de la generación y función de las células reguladoras naturales. 2010;29:74–84.
113. Fernández-Paredes L, de Diego RP, de Andrés C, Sánchez-Ramón S. Close Encounters of the First Kind: Innate Sensors and Multiple Sclerosis. *Mol Neurobiol*. 2016 Jan 5.
114. Peterson RA. Regulatory T-cells: diverse phenotypes integral to immune homeostasis and suppression. *Toxicol Pathol*. 2012;40(2):186–204.
115. Zhao D-M, Thornton AM, DiPaolo RJ, Shevach EM. Activated CD4+CD25+ T cells selectively kill B lymphocytes. *Blood*. 2006 May 15;107(10):3925–32.
116. Grossman WJ, Verbsky JW, Tollefsen BL, Kemper C, Atkinson JP, Ley TJ. Differential expression of granzymes A and B in human cytotoxic lymphocyte subsets and T regulatory cells. *Blood*. 2004 Nov 1;104(9):2840–8.
117. Rosser EC, Mauri C. Regulatory B cells: origin, phenotype, and function. *Immunity*. 2015 Apr 21;42(4):607–12.
118. Jiang H, Chess L. The specific regulation of immune responses by CD8+ T cells restricted by the MHC class Ib molecule, Qa-1. *Annu Rev Immunol*. 2000;18:185–216.
119. Lu L, Kim H-J, Werneck MBF, Cantor H. Regulation of CD8+ regulatory T cells: Interruption of the NKG2A-Qa-1 interaction allows robust suppressive activity and resolution of autoimmune disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Dec 9;105(49):19420–5.
120. Oka A, Ishihara S, Mishima Y, Tada Y, Kusunoki R, Fukuba N, et al. Role of Regulatory B Cells in Chronic Intestinal Inflammation: Association with Pathogenesis of Crohn's Disease. *Inflamm Bowel Dis* [Internet]. 2014;0(0):1–14.
121. Sarabayrouse G, Bossard C, Chauvin JM, Jarry A, Meurette G, Quévrain E, et al. CD4CD8 α Lymphocytes, A Novel Human Regulatory T Cell Subset Induced by Colonic Bacteria and Deficient in Patients with

Inflammatory Bowel Disease. PLoS Biol. 2014;

122. Tejera-Alhambra M, Alonso B, Teijeiro R, Ramos-Medina R, Aristimuño C, Valor L, et al. Perforin expression by CD4⁺ regulatory T cells increases at multiple sclerosis relapse: Sex differences. *Int J Mol Sci*. 2012;13(6):6698–710.
123. Bacchetta R, Barzaghi F, Roncarolo M-G. From IPEX syndrome to FOXP3 mutation: a lesson on immune dysregulation. *Ann N Y Acad Sci*. 2016 Feb 25.
124. Barzaghi F, Passerini L, Bacchetta R. Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, x-linked syndrome: a paradigm of immunodeficiency with autoimmunity. *Front Immunol*. Frontiers Media SA; 2012;3:211.
125. Whiteside TL. What are regulatory T cells (Treg) regulating in cancer and why? *Semin Cancer Biol* [Internet]. 2012 Aug;22(4):327–34.
126. Teh CE, Gray DHD. Can you rely on Treg cells on the rebound? *Eur J Immunol*. 2014 Dec;44(12):3504–7.
127. Morikawa H, Sakaguchi S. Genetic and epigenetic basis of Treg cell development and function: from a FoxP3-centered view to an epigenome-defined view of natural Treg cells. *Immunol Rev*. 2014 May;259(1):192–205.
128. Rothstein DM, Camirand G. New insights into the mechanisms of Treg function. *Curr Opin Organ Transplant*. 2015 Aug;20(4):376–84.
129. Huehn J, Beyer M. Epigenetic and transcriptional control of Foxp3⁺ regulatory T cells. *Semin Immunol*. 2015 Feb;27(1):10–8.
130. Morikawa H, Ohkura N, Vandenbon A, Itoh M, Nagao-Sato S, Kawaji H, et al. Differential roles of epigenetic changes and Foxp3 expression in regulatory T cell-specific transcriptional regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Apr 8;111(14):5289–94.
131. Wang Y, Liu XP, Zhao Z Bin, Chen JH, Yu CG. Expression of CD4⁺ forkhead box P3 (FOXP3)⁺ regulatory T cells in inflammatory bowel disease. *J Dig Dis*. 2011 Aug;12(4):286–94.
132. Maul J, Loddenkemper C, Mundt P, Berg E, Giese T, Stallmach A, et al. Peripheral and intestinal regulatory CD4⁺ CD25(high) T cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2005 Jun;128(7):1868–78.
133. Baecher-Allan C, Viglietta V, Hafler DA. Inhibition of human CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell function. *J Immunol*. 2002 Dec 1;169(11):6210–7.
134. Kubo T, Hatton RD, Oliver J, Liu X, Elson CO, Weaver CT. Regulatory T

- cell suppression and anergy are differentially regulated by proinflammatory cytokines produced by TLR-activated dendritic cells. *J Immunol*. 2004 Dec 15;173(12):7249–58.
135. Qin H-Y, Mukherjee R, Lee-Chan E, Ewen C, Bleackley RC, Singh B. A novel mechanism of regulatory T cell-mediated down-regulation of autoimmunity. *Int Immunol* [Internet]. 2006 Jul;18(7):1001–15.
 136. Grossman WJ, Verbsky JW, Barchet W, Colonna M, Atkinson JP, Ley TJ. Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. *Immunity*. 2004 Oct;21(4):589–601.
 137. Cao X, Cai SF, Fehniger TA, Song J, Collins LI, Piwnica-Worms DR, et al. Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance. *Immunity*. 2007 Oct;27(4):635–46.
 138. Yagita H, Nakata M, Kawasaki A, Shinkai Y, Okumura K. Role of perforin in lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Adv Immunol*. 1992;51:215–42.
 139. Murawski MR, Litherland SA, Clare-Salzler MJ, Davoodi-Semiromi A. Upregulation of Foxp3 expression in mouse and human Treg is IL-2/STAT5 dependent: implications for the NOD STAT5B mutation in diabetes pathogenesis. *Ann N Y Acad Sci*. 2006 Oct;1079:198–204.
 140. Ishikawa D, Okazawa A, Corridoni D, Jia LG, Wang XM, Guanzon M, et al. Tregs are dysfunctional in vivo in a spontaneous murine model of Crohn's disease. *Mucosal Immunol*. 2013 Mar;6(2):267–75.
 141. Canavan JB, Scottà C, Vossenkämper A, Goldberg R, Elder MJ, Shoval I, et al. Developing in vitro expanded CD45RA⁺ regulatory T cells as an adoptive cell therapy for Crohn's disease. *Gut*. 2016 Apr;65(4):584–94.
 142. Ukena SN, Höpting M, Velaga S, Ivanyi P, Grosse J, Baron U, et al. Isolation strategies of regulatory T cells for clinical trials: phenotype, function, stability, and expansion capacity. *Exp Hematol*. 2011 Dec;39(12):1152–60.
 143. Gerseemann M, Wehkamp J, Fellermann K, Stange EF. Crohn's disease--defect in innate defence. *World J Gastroenterol*. 2008 Sep 28;14(36):5499–503.
 144. Marks DJB, Rahman FZ, Sewell GW, Segal AW. Crohn's disease: an immune deficiency state. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2010 Feb;38(1):20–31.

CONSENTIMIENTO INFORMADO DEL ESTUDIO: “Evaluación mediante citometría de flujo multiparamétrica de subpoblaciones linfocitarias en pacientes con Enfermedad de Crohn con tendencia a linfopenia basal, pacientes con Enfermedad de Crohn sin linfopenia y controles sanos”.

La enfermedad de Crohn es una patología de naturaleza autoinmunitaria capaz de afectar a diferentes porciones del aparato digestivo.

En la práctica clínica hemos detectado que existe una proporción de pacientes con enfermedad de Crohn que ya en el momento del diagnóstico presentan linfopenia, una disminución no explicada de un tipo de glóbulos blancos.

Este dato creemos que no ha sido suficientemente investigado, y para completar esto, hemos diseñado un estudio con el fin de verificar si este grupo de pacientes presentan una evolución diferente de los demás y si existe alguna diferencia con los demás pacientes con enfermedad de Crohn en el recuento de cierto tipo de glóbulos blancos.

En su caso, le estamos pidiendo su inclusión en este estudio porque queremos incluirle en uno de los 3 grupos del análisis:

- Usted tiene enfermedad de Crohn con cifras de linfocitos menores de lo habitual.
- Usted tiene enfermedad de Crohn con normalidad en su cifra de linfocitos.
- Usted no tiene enfermedad de Crohn y le necesitamos como control.

Para la realización de este estudio, es necesario analizar mediante un procedimiento técnico muy complejo llamado “citometría de flujo” una única muestra de su sangre con el fin de analizar sus glóbulos blancos.

El estudio no tiene ningún tipo de peligro para usted, ya que no se le administrará ningún fármaco ni se le realizará ningún procedimiento salvo la mencionada punción venosa, hecho molesto pero absolutamente seguro realizado en condiciones de asepsia y por personal entrenado. Si necesita más información o aclaración, no dude en solicitarla. El investigador principal de este estudio es el Dr. Valentín Roales Gómez y se le puede localizar a través del teléfono 615203760.

En cualquier momento puede retirar su consentimiento, siendo en ese momento excluido del estudio y siendo eliminada su muestra sanguínea del banco para su inmediata destrucción sin ningún perjuicio en la atención médica que usted precise por su enfermedad.

En pleno uso de mis facultades mentales y libremente, DOY MI CONSENTIMIENTO para participar en el estudio “Evaluación mediante citometría de flujo multiparamétrica de subpoblaciones linfocitarias en pacientes con Enfermedad de Crohn con tendencia a linfopenia basal, pacientes con Enfermedad de Crohn sin linfopenia y controles sanos”.

En.....a.....de.....de 201...

FIRMA DEL PACIENTE

FIRMA DEL INVESTIGADOR

